



**Etude expérimentale des effets des conditions
environnementales (température, oxygène, polluants)
sur la survie, le développement et le comportement des
stades embryo-larvaires d'esturgeon européen, *Acipenser
sturio***

Nicolas Delage

► **To cite this version:**

Nicolas Delage. Etude expérimentale des effets des conditions environnementales (température, oxygène, polluants) sur la survie, le développement et le comportement des stades embryo-larvaires d'esturgeon européen, *Acipenser sturio*. Ecotoxicologie. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0115 . tel-01293673

HAL Id: tel-01293673

<https://theses.hal.science/tel-01293673>

Submitted on 25 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ETUDE EXPERIMENTALE DES EFFETS DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES
(TEMPERATURE, OXYGENE, POLLUANTS) SUR LA SURVIE, LE
DEVELOPPEMENT ET LE COMPORTEMENT DES STADES EMBRYO-LARVAIRES
D'ESTURGEON EUROPEEN, *ACIPENSER STURIO*



Thèse de doctorat

Soutenue le 25 juin 2015

Pour l'obtention du titre de docteur de l'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Discipline : Ecologie évolutive, fonctionnelle et des communautés

Par Nicolas DELAGE

Composition du jury :

David McKENZIE
Patrick KESTEMONT

Directeur de recherche CNRS (Montpellier, FRANCE)
Professeur Université de Namur (Namur, BELGIQUE)

Rapporteur
Rapporteur

Jorn GESSNER
Patrice COUTURE
Gilles ADAM
Olivier GEFFARD

Senior research scientist IGB (Berlin, ALLEMAGNE)
Professeur INRS ETE (Québec, CANADA)
Chargé de mission DREAL Aquitaine (FRANCE)
Chargé de recherche IRSTEA (Lyon, FRANCE)

Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

Eric ROCHARD
Jérôme CACHOT
Philippe JATTEAU

Directeur de recherche IRSTEA (Bordeaux, FRANCE)
Professeur Université de Bordeaux (Bordeaux, FRANCE)
Ingénieur de recherche IRSTEA (Bordeaux, FRANCE)

Directeur de thèse
Directeur de thèse
Examineur invité

Financement :



Pour mieux
affirmer
ses missions,
le Cemagref
devient Irstea



*"Quand le dernier arbre sera abattu, la dernière rivière empoisonnée, le dernier poisson capturé,
alors seulement vous vous apercevrez que l'argent ne se mange pas."*

Maxime amérindienne Cree

RESUME

Etude expérimentale des effets des conditions environnementales (Température, Oxygène, Polluants) sur la survie, le développement et le comportement des stades embryo-larvaires d'esturgeon européen, *Acipenser sturio*

L'esturgeon européen *Acipenser sturio* est un poisson migrateur amphihalien qui a connu un fort déclin au cours du 20^{ème} siècle. La dernière population vit dans le bassin Gironde-Garonne-Dordogne (GGD) et sa dernière reproduction connue date de 1994. Les individus relâchés lors de repeuplements sont supposés venir se reproduire prochainement. Du fait du changement global et de l'évolution des activités humaines, une meilleure connaissance de la vulnérabilité des jeunes stades de *A. sturio* vis-à-vis de la température, de la disponibilité en oxygène et des polluants s'est avérée nécessaire. La sensibilité aux conditions oxythermiques actuelles et à venir a été évaluée ainsi que la qualité des sédiments des frayères. Enfin, la sensibilité des jeunes stades de cette espèce à des mélanges de polluants représentatifs du bassin GGD a été également évaluée. Une forte sensibilité des jeunes stades de *A. sturio* au taux d'oxygène a été mise en évidence. Les fenêtres optimales et critiques de tolérance ont été estimées. La toxicité des sédiments de frayères de Dordogne est globalement supérieur à celle des sédiments de frayères de Garonne. Beauregard et Pessac-sur-Dordogne semblent être respectivement les sites les plus favorables et défavorables aux jeunes stades. La sensibilité de *A. sturio* aux polluants rencontrés dans le bassin est relativement faible. Les conditions environnementales actuelles du bassin GGD semblent globalement satisfaisantes pour accueillir le développement de jeunes stades de *A. sturio*. Les données collectées dans cette étude pourront servir pour d'autres programmes de réintroduction de cette espèce.

Mots clés : Esturgeon européen ; jeunes stades ; température ; oxygène ; polluants ; sensibilité ; tolérance ; sédiment

Unités de recherche

Ecosystèmes Aquatiques et changements globaux (EABX) -IRSTEA
50 avenue de Verdun, 33610 Cestas

Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC) – UMR 5805
Allée Geoffroy Saint-Hilaire - CS 50023 - 33615 Pessac

Experimental study of environmental conditions effects (temperature, oxygen, pollutants) on survival, development and behaviour of European sturgeon, *Acipenser sturio*, embryo-larval stages

The European sturgeon *Acipenser sturio* is a diadromous species which has exhibited a drastic decline during the 20th century. Its last population lives in the Gironde-Garonne-Dordogne (GGD) catchment where the last documented reproduction occurred in 1994. Individuals released in the context of restocking actions are expected to re-enter the system for reproduction in the next few years. Because of global changes and human activity evolution, environmental conditions have changed from the last reproduction. Improved knowledge on the sensitivity of the European sturgeon to temperature, dissolved oxygen and pollutant is required to evaluate its capacities to recolonize the GGD catchment. Sensitivity to present and future, considering global changes, oxygen and temperature conditions were evaluated as well as quality of the substratum of potential spawning grounds. The sensitivity of the early stages toward a mix of pollutants found in the GGD catchment was evaluated. Results obtained show a high sensitivity of the young stages of this species to oxygen concentration. Thermal optimum, optimal and critical tolerance windows were determined. Sensitivity to pollutants mixtures found in the GGD was relatively low. Dordogne river substratum was globally more toxic than Garonne river substratum. Beauregard and Pessac-sur-Dordogne were tested respectively as the best and the worst potential spawning ground for the development of the European sturgeon early stages according to their toxicological effects. Current conditions in the GGD catchment seems to be sustainable for European sturgeon early stages. Data from this study would be useful for further restocking programs in the historical european sturgeon reproduction area.

Keywords: European sturgeon; early stages; temperature; oxygen; pollutants; sensitivity; tolerance; sediment

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont aux organismes qui ont permis par leur concours financier de réaliser ce travail de doctorat, la Région Aquitaine et IRSTEA (ex-CEMAGREF). Ce travail a été fait au sein de l'université de Bordeaux dans l'unité LPTC de l'UMR EPOC et d'IRSTEA dans l'Unité EABX (ex-EPBX) dont je remercie les directeurs respectifs, Hélène Budzinski, Eric Rochard et Paul Gonthier.

Dans un premier temps je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Eric Rochard et Jérôme Cachot, qui m'ont permis de réaliser ce travail dans des conditions particulièrement bonnes. A ces deux directeurs officiels, s'ajoute Philippe Jatteau qui a joué un rôle extrêmement important tout au long de ce travail. A vous trois, vos conseils et votre soutien ont été plus que précieux et pas uniquement dans le cadre scientifique et technique.

Deux autres personnes ont eu un rôle très important dans mes choix méthodologiques par leurs conseils avisés. Alors, merci à Marie-Laure Acolas pour nos tribulations autour de l'esturgeon, pour m'avoir donné ma chance dès 2009 et pour ton accueil souriant à chaque fois que je suis venu te déranger dans ton bureau par mes questions souvent très naïves. Merci à Patrick Lambert pour nos grandes discussions quasi métaphysiques sur les chiffres et leurs côtés sombres.

Merci à l'ensemble des participants aux différents comités de thèse qui m'ont guidés dans mes choix parmi lesquels Jörn Gessner, Gilles Adam et Olivier Geffard avec qui les discussions ont été plus que productives. Merci également à Bénédicte Morin pour son expertise, particulièrement sur les tests de génotoxicité. Merci à l'ensemble des partenaires du projet SturTOP pour leur réactivité et leur implication.

Dans ce travail expérimental, j'ai eu un lien privilégié avec une partie des personnels techniques et assistants ingénieurs dans les deux instituts au premier rang desquels les personnels de la station de Saint Seurin dirigée par Patrick Chèvre. J'ai été particulièrement épaulé à la station par Rémy Fraty et Louis Jacobs. Travailler avec vous a été un vrai plaisir et je garde de supers souvenirs en tête. J'ai eu la chance de travailler tout au long de cette thèse et à diverses occasions avec Laure Landi et Charline Gesset avec qui j'ai noué des liens d'amitié plus que des liens de travail. Un grand merci également à Stéphane Bons et Romaric Le Barh qui m'ont accompagné à de multiples reprises sur le terrain.

J'ai également eu la chance de travailler avec aux côtés de Christelle Clérandeau et Floranne Le Bihanic au sein de l'équipe Ecotoxicologie Aquatique du laboratoire EPOC et cette expérience m'a beaucoup apporté.

Je voulais également remercier Blandine Couturier et Elodie Eveilleau que j'ai eu la chance de pouvoir encadrer au cours de leurs stages de M2 respectifs. Elles m'ont appris certainement plus de choses que ce que moi j'ai pu leur apprendre.

De façon plus personnelle, je ne serais pas arrivé à finir ce manuscrit et plus généralement ma thèse sans ma famille.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| Résumé..... | 5 |
| Remerciements | 9 |
| Table des matières | 13 |
| Introduction générale..... | 19 |
| I. L'esturgeon européen, une espèce patrimoniale | 21 |
| A. Biologie | 21 |
| B. Déclin de l'espèce, quelques pistes | 23 |
| 1. Surpêche..... | 23 |
| 2. Barrières à la migration..... | 24 |
| 3. Modification des frayères..... | 25 |
| C. Distributions passée, présente et future | 26 |
| II. Concept de niche écologique, implication pour l'esturgeon | 28 |
| A. Définition du concept dans la littérature | 28 |
| 1. Concept de niche écologique..... | 28 |
| 2. Limite du concept de niche écologique et apports du concept de tolérance.. | 29 |
| B. Modifications des conditions phyco-chimiques | 30 |
| 1. Augmentation de la température | 30 |
| 2. Hypoxie | 32 |
| C. Pollution du bassin de GGD | 34 |
| 1. Notions générales sur les polluants | 34 |
| a. Définition de polluant chimique | 34 |
| b. Notion de biodisponibilité d'un polluant..... | 35 |
| c. Notions de bioconcentration, bioaccumulation et de bioamplification..... | 36 |
| d. Synergie, antagonisme et additivité | 36 |
| 2. Ampleur de la contamination du bassin de GGD..... | 37 |

| | |
|---|------------------|
| a. Les métaux | 37 |
| b. Les polluants organiques persistants (POPs) | 40 |
| c. Les produits phytosanitaires, pharmaceutiques et vétérinaires | 43 |
| III. Enjeux et objectifs de cette étude | 44 |
| A. Enjeux de la thèse | 44 |
| 1. Retour de géniteurs..... | 44 |
| 2. Transposition des résultats à d'autres bassins versants | 45 |
| B. Objectifs de la thèse | 45 |
| <i>Chapitre 1 : Démarche et choix méthodologiques</i> | <i>47</i> |
| I. Evaluer la tolérance de l'esturgeon vis-à-vis de la température et de l'oxygène | 48 |
| A. Etablir les conditions expérimentales..... | 48 |
| B. Développement d'un dispositif d'exposition des embryons et larves d'esturgeon | 50 |
| C. Différents niveaux d'intégration..... | 51 |
| D. Evolution de la sensibilité avec l'âge | 52 |
| II. Evaluer la qualité des sédiments de frayères..... | 52 |
| A. Etat de contamination des frayères a priori | 52 |
| B. Collecte de sédiments..... | 54 |
| C. Remplacer l'esturgeon par un modèle, est ce faisable ? | 56 |
| D. Test MELAc | 56 |
| E. Tester la viabilité des esturgeons et la variabilité des conditions dans le milieu... | 57 |
| III. Evaluer la tolérance de l'esturgeon vis-à-vis des polluants | 58 |
| A. Etat de contamination d'un site connu..... | 58 |
| B. Etablir les conditions d'exposition réalistes..... | 58 |
| C. Adaptation du protocole | 58 |
| IV. Conclusion | 59 |

Chapitre 2 : Tolérance des très jeunes stades d'esturgeons vis-à-vis de la température et de l'oxygène..... 61

I. Préambule.....62

Article n°1 : Oxythermal window drastically constraints the survival and development of European sturgeon early life stages.....63

II.Synthèse des résultats et lien avec le chapitre n°3.....86

Chapitre 3 : Evolution de la tolérance à l'hypoxie des jeunes stades d'esturgeon européen à deux températures différentes en fonction de l'âge 87

I. Préambule.....88

Article n°2 : Hypoxia tolerance of European sturgeon (*Acipenser sturio*) young stages at two temperatures.....90

II.Synthèse des résultats et lien avec le chapitre n°4.....109

Chapitre 4 : Le test embryo-larvaire médaka peut-il remplacer le test embryo-larvaire esturgeon dans l'évaluation de la qualité des frayères 111

I. Préambule.....112

Article n°3 : How sensitive are European sturgeon and Japanese medaka embryos to substratum quality from sturgeon spawning ground ?.....113

II.Synthèse des résultats et lien avec le chapitre n°5.....132

Chapitre 5 : Evaluation de la qualité des frayères de l'esturgeon européen par le test embryo-larvaire médaka 133

| | |
|--|-------------------|
| I. Préambule..... | 134 |
| Article n°4 : Japanese medaka embryo-larval assay as an alternative to evaluate European sturgeon's spawning ground substratum toxicity.... | 135 |
| II.Synthèse des résultats et lien avec le chapitre n°6..... | 156 |
| <i>Chapitre 6 : Evaluation de la sensibilité du stade embryo-larvaire d'esturgeon européen aux sédiments dopés.....</i> | <i>158</i> |
| I. Préambule..... | 159 |
| Article n°5 : European sturgeon's early life stage sensitivity to spiked sediment at two different temperatures | 161 |
| II.Synthèse des résultats | 180 |
| <i>Discussion générale, conclusions et perspectives.....</i> | <i>182</i> |
| I. Hiérachisation des risques pour les embryons et larves de A. sturio . | 184 |
| II.Qualité des frayères | 186 |
| III. Le repeuplement d'autres bassins versants | 187 |
| IV. Conclusion et perspectives | 191 |
| <i>Bibliographie.....</i> | <i>194</i> |
| <i>Tables des illustrations.....</i> | <i>216</i> |
| I. Figures | 217 |
| II.Tables..... | 221 |

INTRODUCTION GENERALE

Cette étude se place dans le contexte d'un déclin drastique de la population d'esturgeon européen, *Acipenser sturio*. Cette espèce, présente dans la majeure partie des grands bassins versants européens au début du 20ème siècle, a vu sa population diminuer en terme d'effectif et d'aire de répartition. Aujourd'hui, elle n'est plus représentée que par une seule population sauvage dans le bassin Gironde-Garonne-Dordogne. Dans ce dernier bassin versant, la dernière reproduction naturelle connue de l'espèce a eu lieu en 1994.

La constitution de deux stocks captifs, l'un en France et l'autre en Allemagne, a permis de soutenir la population existante dans le bassin Gironde-Garonne-Dordogne et de tenter de recréer la population de l'Elbe. Dès 1995 une reproduction assistée a permis d'effectuer un lâché de quelques centaines d'individus dans le bassin versant français et de compléter le stock d'individus reproducteurs sur les deux sites. Les succès de reproductions assistées obtenus depuis 2007 ont permis de soutenir cette population fragile en relâchant plus de 1,6 millions d'individus à divers stades de développement.

Les individus issus de la reproduction naturelle de 1994 et relâchés en 1995 sont attendus prochainement pour se reproduire dans le bassin Gironde-Garonne-Dordogne. Jusqu'aux présents travaux, la sensibilité des jeunes stades, et particulièrement les stades embryo-larvaires, aux conditions environnementales restait basée sur des connaissances empiriques. Ces stades de développement sont connus pour être des périodes particulièrement critiques chez les poissons de façon générale. Ainsi, un réel besoin d'éclairage sur la vulnérabilité des très jeunes stades s'est fait ressentir concernant trois de ces facteurs (la température, la concentration en oxygène et la concentration en polluant). L'élévation des températures du fait du changement climatique et de la modification des activités humaines pourrait influencer sur le développement des jeunes stades d'esturgeon européen. De même, la diminution de la disponibilité en oxygène, liée en partie à la modification de la température, est de nature à altérer ces stades précoces. Enfin, l'action des polluants sur les jeunes stades de poisson est une préoccupation rencontrable dans l'ensemble des bassins versants anthropisés.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet SturTOP financé par la région Aquitaine (N°20111206001) et l'ANR CESA (ANR-13-CESA-0018-01).

I. L'esturgeon européen, une espèce patrimoniale

A. Biologie

L'esturgeon européen *Acipenser sturio* fait partie de la classe des Actinoptérygiens, i.e. poisson à nageoires rayonnées, et de la sous-classe des Chondrostéens, i.e. dont le squelette est cartilagineux (Lecointre et al., 2001). La sous-classe des Chondrostéens est constituée de 27 espèces dont 17 font partie du genre *Acipenser* (Magnin, 1959; Rochard et al., 1990; Rochard et al., 1991; Williot et al., 2011b) réparties entre l'Amérique du nord et l'Eurasie. Ici, le terme de poisson sera utilisé *lato sensus* c'est à dire pour désigner l'ensemble des cordés à respiration aquatique pourvus de nageoires et non uniquement les téléostéens.

L'esturgeon européen est le plus grand poisson d'Europe de l'Ouest avec une taille maximale enregistrée de plus de 3 m (Laporte, 1853; Magnin, 1962). Il s'agit d'un poisson benthodémersal présentant une bouche protractile en position ventrale. La détection des proies est assurée à faible distance par quatre barbillons sensoriels en avant de la bouche et par électroreception. Cinq rangées d'écussons alignés le long du corps, ainsi que le premier rayon des nageoires pectorales, forment les uniques parties osseuses de l'esturgeon européen (Lepage and Rochard, 1995). La nageoire caudale est hétérocerque.

A l'instar du saumon Atlantique *Salmo salar* ou de la grande alose *Alosa alosa*, l'esturgeon européen est un poisson migrateur amphihaline potamotocue (afin de simplifier nous parlerons dans la suite de ce document de poissons diadromes) (McDowall, 1997). Il se reproduisait en eau douce dans la partie basse des grands fleuves européens de la mer Baltique à la mer Noire (Lassalle et al., 2010a). La période de reproduction est variable selon le fleuve considéré. Dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne (GGD), qui nous intéressera dans la suite de ce travail, elle intervenait entre les mois de mai et juin (Magnin, 1962). La reproduction avait lieu dans des frayères présentant des caractéristiques hydrodynamiques et sédimentaires particulières (Jego et al., 1997; Jego et al., 2002). La profondeur doit être au minimum de 5 m au droit de la fosse, tandis que la vitesse de courant doit être comprise entre 0,5 et 1,5 m.s⁻¹ ; le fond doit être hétérogène et constitué de gravier de 3 à 250 mm de diamètre.

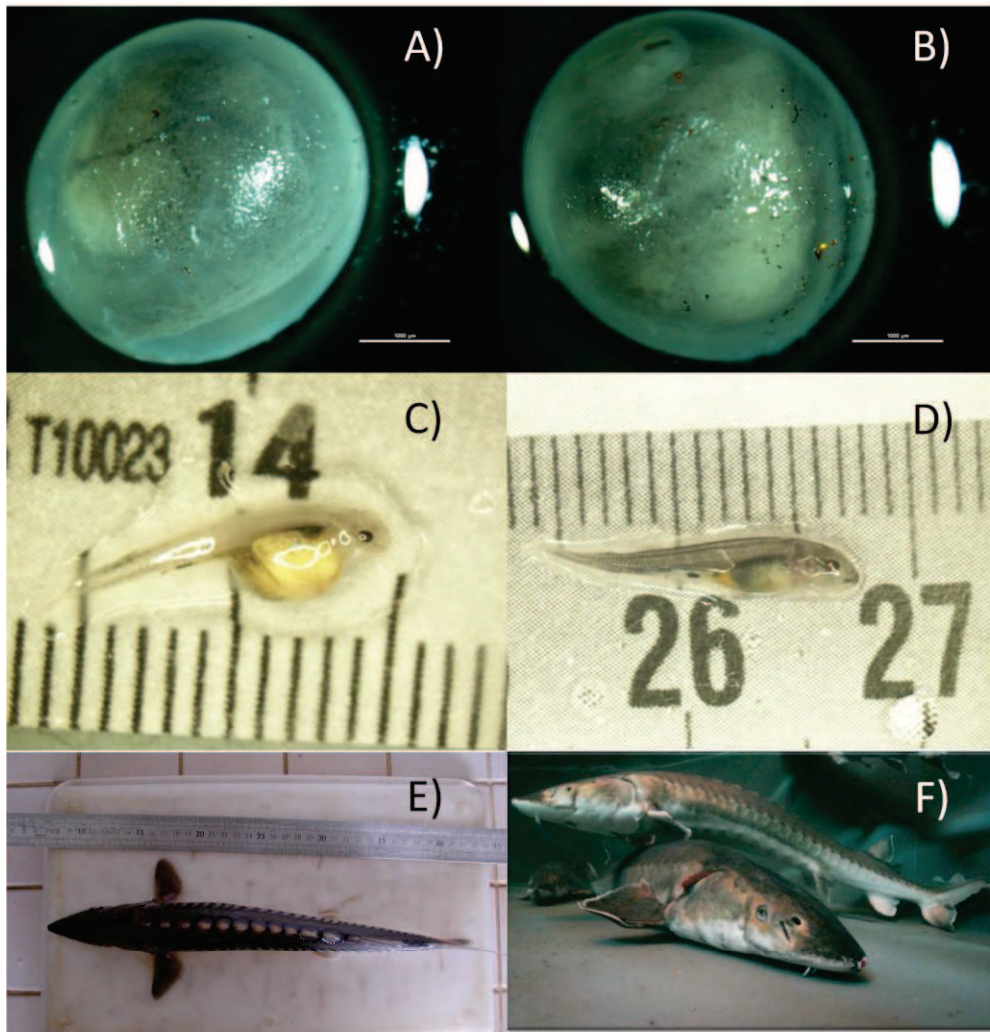


Figure 1 : Développement embryo-larvaire de l'esturgeon européen à 4 heures post fécondation (hpf) stade 4 cellules (A), 80 hpf stade ocellé (B), 1 jour post éclosion (dph) (C), 8 dph (D), 1 an (E) et adulte mature (F).

La fécondation est externe, permise par le contact de l'eau qui active les spermatozoïdes et déclenche la fermeture progressive des micropyles des ovocytes (Williot et al., 2011a). Une fois fécondés, les œufs deviennent adhésifs et s'accrochent à l'ensemble des substrats disponibles (graviers, algues, végétaux, ...). Le développement embryonnaire est rapide, environ quatre jours à 18°C (Rouault et al., 2008; Williot et al., 2009). La phase pro-larvaire dure six jours à 18°C à la fin desquels la première alimentation intervient (Rouault et al., 2008). Durant cette période, les larves (Figure 1, page 22) restent particulièrement inféodées au substrat. Les juvéniles vont alors migrer dans l'estuaire durant leur premier hiver (Rochard et al., 2001) où ils vont rester durant quatre à cinq ans (Taverny et al., 2002; Lepage et al., 2005) effectuant des migrations de plus en plus longues en zones côtières (Acolas et al., 2011). A ce stade, l'alimentation de l'esturgeon européen est essentiellement constituée de larves d'insectes (chironomes particulièrement) et de crustacés (Brosse et al., 2000; Acolas et al., 2011; Brosse et al., 2011). L'esturgeon européen va

alors croître en zones côtières le long du plateau continental. Des captures au large des côtes bretonnes permettent d'estimer que l'aire de répartition des adultes et des sub-adultes s'étend jusqu'à cette zone (Rochard et al., 1997). Le retour en rivière s'effectue lors de l'acquisition de la maturité sexuelle vers l'âge de huit/dix ans pour les mâles et de quatorze/quinze ans pour les femelles (Magnin, 1962; Acolas et al., 2011). L'esturgeon européen est une espèce itéropare qui peut se reproduire tous les deux à quatre ans (Williot et al., 2011a).

B. Déclin de l'espèce, quelques pistes

L'esturgeon européen a connu depuis la fin du 19ème siècle un déclin drastique et rapide de sa population en termes d'abondance et d'aire de répartition. L'analyse documentaire réalisée par Williot et Castelnaud (2011) permet de prendre la mesure de ce déclin. L'aire de répartition historique de l'esturgeon européen s'étendait de la mer Baltique à la mer Noire jusqu'au début du 20ème siècle (Classen, 1944; Velez Soto, 1951; Gutierrez-Rodriguez, 1962; Ninua, 1976; Almaça, 1988; Almacá and Elvira, 2000; Pagès et al., 2008; Chassaing, 2010; Lassalle et al., 2010b). L'éradication de l'espèce de la plupart des grands bassins versants n'est pas un phénomène récent (Roule, 1922). Aujourd'hui, son aire de répartition se limite au seul bassin de Gironde-Garonne-Dordogne (GGD) et ne représente plus qu'un faible nombre d'individus. Par ailleurs, la dernière reproduction naturelle est datée de 1994 (Lepage and Rochard, 1995) grâce à l'observation de jeunes stades. Quelques pistes ont été avancées afin d'expliquer ce déclin, certaines basées sur des données scientifiquement établies comme la surpêche ou la réduction des habitats disponibles (Rochard et al., 1990; Williot and Castelnaud, 2011), d'autres sur des considérations empiriques comme la sensibilité aux conditions physico-chimiques actuelles (Charpy, 1951; Velez Soto, 1951; Fernandez-Pasquier, 1999; Fernandez-Pasquier, 2000) ou aux polluants (Williot et al., 1997). Aucune étude n'ayant encore été menée sur l'impact des polluants sur l'esturgeon européen, celle-ci ne sera pas développée dans les causes probables de déclin de l'espèce.

1. Surpêche

De longue date, l'esturgeon européen a été pêché pour sa chair et son caviar, non seulement pour la consommation humaine et la fabrication de colle, mais aussi pour la fertilisation des terres ou encore la nutrition animale (Gessner et al., 2011). Dès 1853, en France, un décret limite la taille des prises d'esturgeons à 27 cm minimum de l'œil à la fourche. La taille de la maille des filets, ainsi que la longueur totale des captures autorisées, n'a cessé d'évoluer au fil du temps

jusqu'à l'interdiction totale de la pêche à l'esturgeon en mer et estuaire en 1981, puis en rivière en 1982 (Figure 2, page 24). Une illustration de l'impact de la surpêche sur l'esturgeon européen est la diminution des captures dans l'Elbe (Allemagne) passant de 4000-7000 prises annuelles entre 1880 et 1890 à des prises anecdotiques en seulement 25 ans (Kirschbaum et al., 2011). De même, au début du 20ème siècle, les captures d'esturgeons représentaient près de 200 tonnes annuelles en mer Baltique (Kolman and Zarkua, 2000; Kolman et al., 2011). Le dernier esturgeon capturé dans cette zone est daté de 1984 (Podushka, 1999). Au milieu des années 1930 en Italie, *A. sturio* représentait 80% des captures totales d'esturgeons loin devant *A. naccarii* et *Huso huso*. Les derniers esturgeons européens d'Italie ont été capturés dans le Piave et la Livenza en 1991 (Bronzi et al., 2011).

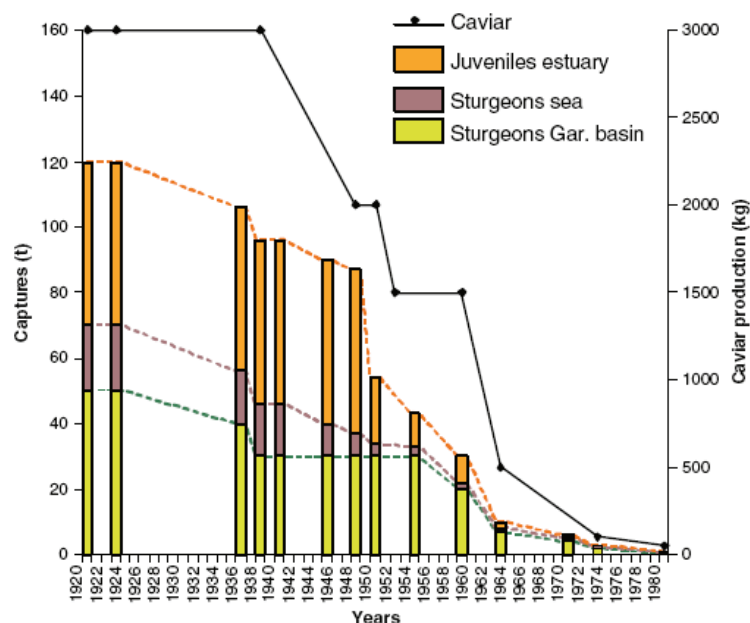


Figure 2 : Evolution des captures d'esturgeons et de la production de caviar dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne au cours du 20ème siècle (Castelnaud, 2011).

2. Barrières à la migration

Comme nous l'avons vu précédemment, l'esturgeon est un migrateur amphihalin dont la reproduction s'effectue en rivière sur des zones bien particulières. La construction de barrages ou de seuils sur les fleuves a été pointée du doigt comme altérant la migration de l'esturgeon européen au début du 20ème siècle. Le barrage de Beauregard (près d'Agen), par exemple, empêche les adultes de remonter le cours de la Garonne jusqu'à Toulouse comme ils le faisaient auparavant (Roule, 1922). A l'instar de la Garonne, la plupart des grands fleuves que colonisait l'esturgeon européen ont été barrés ou aménagés pour les activités humaines, privant *A. sturio* de ses frayères historiques (e.g. Bergerac sur la Dordogne, Nordfeld sur l'Eider, Alcalá de Rio sur le

Guadalquivir (Fernandez-Pasquier, 1999)). Un lien peut être établi directement entre la construction d'ouvrages comme celui de Nordfeld en 1934 et la chute du recrutement de jeunes esturgeons dans l'Eider. Dans cette rivière, la dernière capture d'esturgeon est datée de 1969. La rivière Po a été barrée une première fois en 1874 puis en 1962, constituant ainsi des barrières à la migration de l'esturgeon européen (Bronzi et al., 2011).

3. Modification des frayères

L'extraction de granulats a constitué une activité importante dans le bassin de GGD qui a conduit à la dégradation de la majeure partie des frayères d'esturgeons européens (Williot and Castelnaud, 2011). Cette activité initiée dans la Garonne au lendemain de la seconde guerre mondiale s'est poursuivie jusqu'au milieu des années 1990 (Lepage et al., 2000a).

La construction de barrages impacte également les frayères en aval en impactant l'hydrologie du site et les apports en sédiments nouveaux, modifiant ainsi la structure du lit de la rivière (Williot and Castelnaud, 2011). Du fait de leurs caractéristiques sédimentaires particulières, les frayères sont très souvent situées dans les méandres des fleuves où les graviers de taille convenable pour l'esturgeon européen se déposent. La chenalisation des fleuves et l'artificialisation des berges altèrent les dépôts sédimentaires en supprimant certaines barres sablonneuses (Bronzi et al., 2011), privant l'esturgeon européen de certaines de ses frayères. La modification de cette circulation d'eau induit également le dépôt de particules fines sur les frayères jusqu'à ce que celles-ci soient colmatées et rendues inutilisables pour l'esturgeon européen.

Selon Williot et Castelnaud (2011), l'altération des milieux, évalué par le nombre de frayères disponibles, a conduit à une réduction respective de 33 et 88% des sites utilisables pour l'esturgeon européen en Dordogne et en Garonne.

L'ensemble de ces facteurs a conduit à une diminution drastique et rapide des effectifs et de l'aire de répartition de l'esturgeon européen. Dans la littérature, l'impact des polluants est plusieurs fois mentionné pour ses effets possibles sur la capacité reproductive des adultes, la survie et la croissance des jeunes stades (Williot et al., 1997; Maury-Brachet et al., 2008; Bronzi et al., 2011; Gessner et al., 2011; Kolman, 2011; Kolman et al., 2011; Williot and Castelnaud, 2011). Cependant ces suppositions se basent sur des principes généraux issus de l'étude d'autres espèces voire d'autres groupes taxonomiques. Plus récemment, l'augmentation de la température des eaux fluviales a été évoqué et soupçonné d'être à l'origine de la modification de l'aire de répartition de l'espèce (Lassalle et al., 2010b).

C. Distributions passée, présente et future

Comme nous l'avons vu précédemment, la distribution géographique de l'esturgeon européen s'étendait, au milieu du 19^{ème} siècle, de la mer Baltique à la mer Noire. Un important travail de documentation réalisé par Lassalle et al. (2010b) a permis de discriminer l'ensemble des grands bassins versants européens en fonction de leur capacité à accueillir cette espèce dans le passé et aussi de faire des projections en se basant sur les scénarii établis par le GIEC (2007).

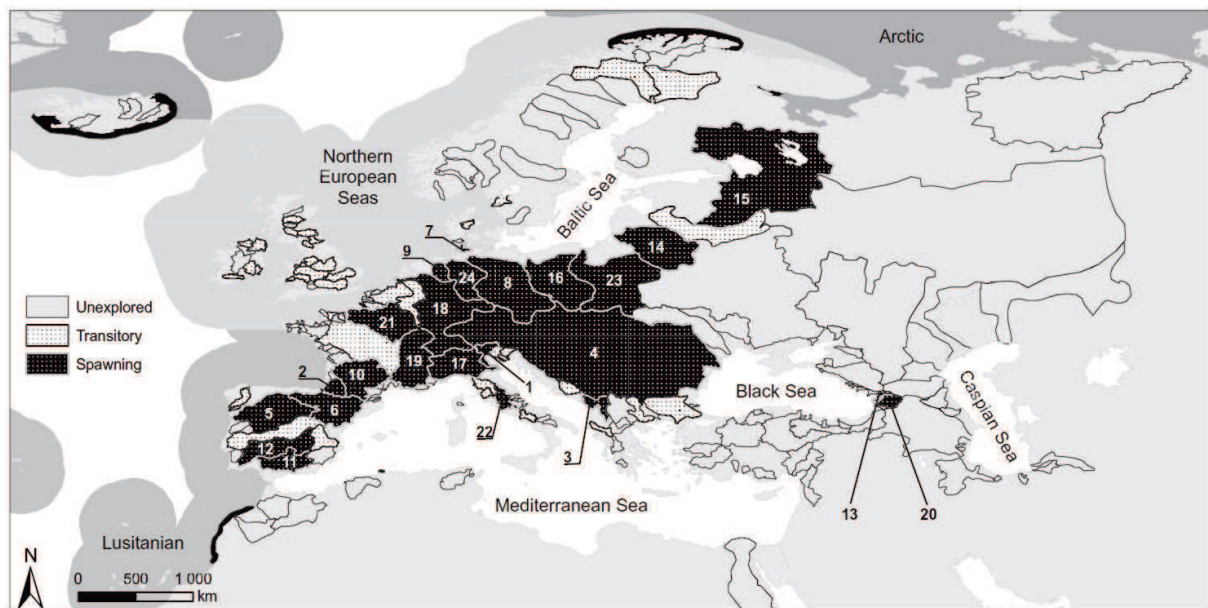


Figure 3 : Distribution continentale de l'esturgeon européen vers 1750-1850 (Lassalle et al., 2010b). La distinction est faite entre trois groupes fonctionnels des bassins versants. Les captures côtières sont rapportées aux marges extrêmes de l'aire de distribution de l'esturgeon européen par les bandes noires. Le bassin versant du Nil est tronqué afin de permettre une vision plus claire des autres bassins versants. Les numéros 1 à 24 correspondent aux différents bassins versants dans lesquels l'esturgeon européen a été présent classés par ordre alphabétique.

Si l'aire de répartition de l'esturgeon européen est aujourd'hui limitée au bassin de GGD, celle-ci comprenait jusqu'au milieu du 19^{ème} siècle la plupart des estuaires et grands bassins versants européens (Lassalle et al., 2010b). Ces derniers auteurs font la distinction entre trois groupes fonctionnels (Figure 3, page 26) :

- les zones non explorées, bassins versants ayant la capacité d'accueil et des conditions environnementales soutenables pour l'esturgeon européen mais dans lesquels les relevés ne font pas état de sa présence ;

- les zones transitoires, bassins versants où l'esturgeon européen a été observé sans pour autant que des reproductions aient été constatées ;
- les zones de pontes, correspondant aux bassins versants dans lesquelles des comportements reproducteurs ont été observés.

Dans son rapport, le GIEC (2007) établit plusieurs scénarii d'évolution potentielle du climat parmi lesquels les prévisions A2 et A1FI ont été utilisées par Lassalle et al. (2010b). Ces scénarii correspondent aux prévisions les plus pessimistes pour les années 2050 et 2100. Un changement drastique du potentiel offert par les différents bassins versants est observable (Figure 4, page 28). L'une des conclusions majeures de cette étude est le glissement vers le nord de l'Europe de l'ensemble des zones capables d'accueillir une reproduction d'esturgeon européen. Ainsi, à l'horizon 2100, l'ensemble des zones de reproduction potentielle se situeraient au-delà du 48^{ème} parallèle de latitude nord.

En dépit de la qualité de ce travail, l'établissement des zones potentielles de reproduction à l'horizon 2100 se base sur des températures de l'air comprises entre 7,7 et 22°C pendant la période de reproduction de l'esturgeon européen. Or ces températures, bien qu'issues du modèle permettant d'établir la Figure 3 (page 26), n'ont jamais été vérifiées expérimentalement comme faisant partie de la gamme de tolérance des très jeunes stades d'esturgeon.

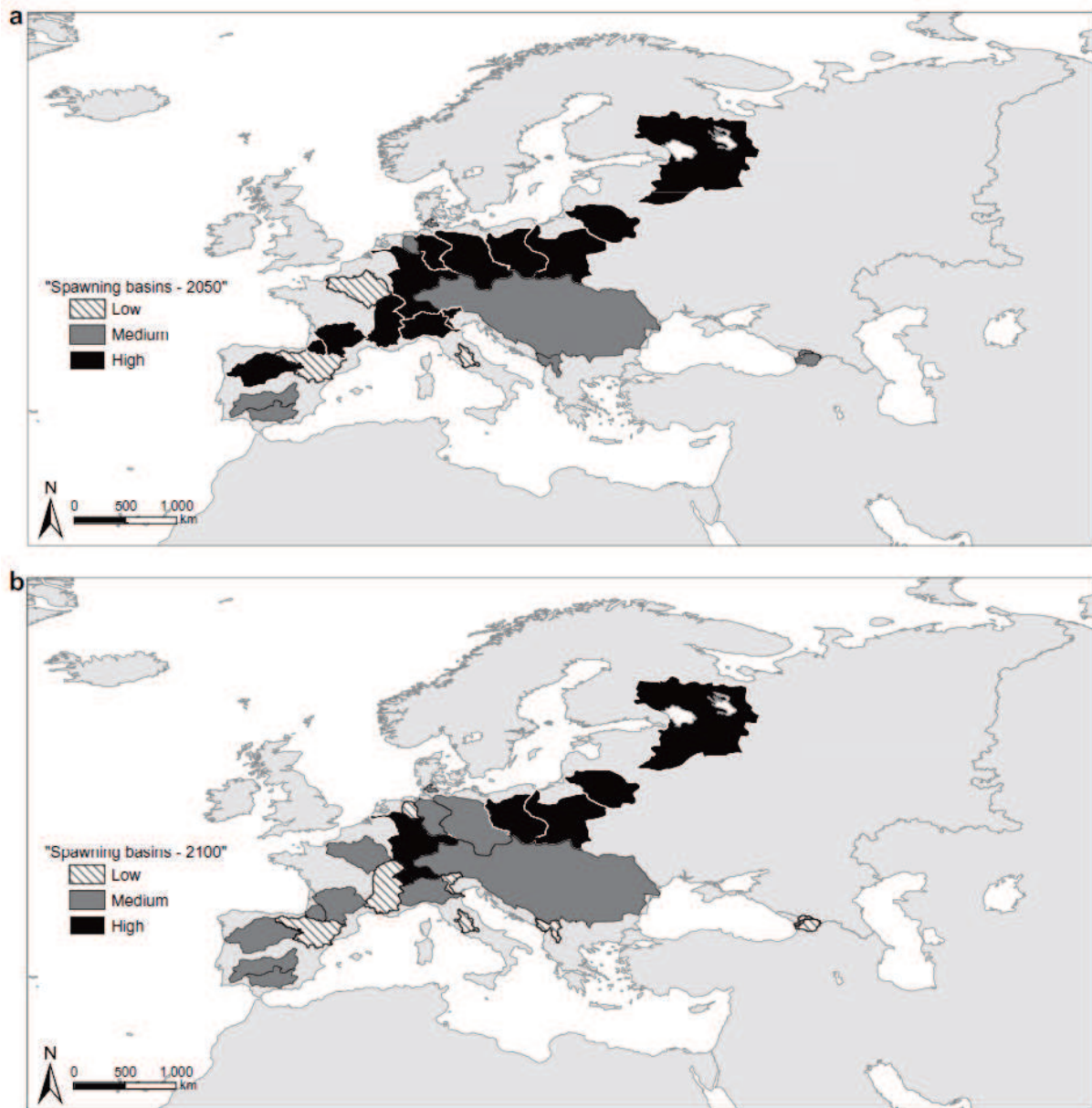


Figure 4 : Probabilité que les différents bassins versants présentent les conditions nécessaires pour accueillir une reproduction d'esturgeon européen selon les scénarii A2 et A1FI pour 2050 et 2100 d'après Lassalle et al. (2010b).

II. Concept de niche écologique, implication pour l'esturgeon

A. Définition du concept dans la littérature

1. Concept de niche écologique

L'esturgeon européen, comme toute espèce animale ou végétale, occupe un milieu bien particulier défini par les relations inter- et intra-spécifiques entretenues avec les autres espèces au sein d'une communauté et aussi par des conditions environnementales particulières. Ces

conditions constituent une niche écologique au sein d'un milieu où chaque espèce possède une fonction. Le concept de niche écologique, décrit par Hutchinson (1957) et précisé par la suite par ce même auteur (1991) est encore débattu aujourd'hui (Warren, 2012; McNerny and Etienne, 2013; Warren, 2013), tant sur la sémantique que sur la manière d'utiliser ce concept (Mikkelsen, 2005). Dans ce chapitre, nous entendrons par "niche écologique" le concept décrit par Hutchinson (1991). Cet auteur définit la niche écologique d'une espèce comme un hyper volume à n dimensions où n représente chacune des variables environnementales indépendantes. Cet hyper volume est borné par les valeurs extrêmes de cette variable permettant à l'espèce considérée de survivre et de se reproduire. Dans ce concept, l'ensemble des variables physiques et biologiques sont considérées indifféremment. Ainsi, n'importe quel point de cette niche inclut une probabilité égale de persistance de l'espèce, tandis que pour n'importe quel point situé au dehors de cet hyper volume la probabilité de survie de l'espèce considérée serait nulle.

L'auteur ajoute à son concept une notion de temporalité. Ainsi, l'existence d'une niche écologique donnée se réfère à un seul et unique instant. Pour exemple, une espèce diurne et une autre nocturne occuperont deux niches écologiques distinctes même si l'ensemble des autres variables environnementales constituant leurs niches sont identiques.

2. Limite du concept de niche écologique et apports du concept de tolérance

L'une des principales limites du concept de niche écologique dans la compréhension des phénomènes biologiques est le fait que, selon la définition d'Hutchinson (1991), la probabilité de persistance d'une espèce est égale en tout point de sa niche écologique. Ce dernier auteur borne les variables environnementales constitutives de la niche d'une espèce par les limites de survie et de reproduction de l'espèce, c'est à dire, les conditions critiques. Pörtner (2001) définit quatre seuils permettant de caractériser le potentiel d'une espèce donnée face à un facteur environnemental changeant. L'un des exemples de facteurs environnementaux communs à l'ensemble des êtres vivants est la température. Ainsi, Pörtner (2001) définit la tolérance au moyen de seuils de températures critiques basses et hautes (respectivement T_{cI} et T_{cII}) au-delà desquels la survie de l'individu est impossible, et aussi des seuils dit de températures *pejus* (noté T_{pI} et T_{pII}). Ces seuils correspondent à l'apparition d'un stress oxydant et à la diminution des capacités (survie, croissance, reproduction, ...) d'une espèce donnée. Il est important de noter que ces seuils sont dépendants de l'espèce, de la saison, de la latitude et du stade considéré.

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur des facteurs impactés par le changement global (la température et la disponibilité en oxygène dissous) et locaux (la pollution de l'eau).

B. Modifications des conditions physico-chimiques

1. Augmentation de la température

Selon le cinquième rapport du GIEC (Groupe d'expert Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (IPCC, 2013)), l'augmentation de la température de la surface du globe ne fait plus aucun doute. L'augmentation de la température de l'air calculée sur la période 1880 à 2012 est de l'ordre de $0,85 \pm 0,205$ °C. Comparativement aux données précédentes (IPCC, 2007), sur la même période, l'augmentation de température a été revue à la hausse. Les auteurs estiment que les 30 dernières années ont été les plus chaudes de ces 14 derniers siècles. La température de la surface de l'océan global (jusqu'à 75 m de profondeur) a augmenté de $0,11 \pm 0,02$ °C par décennie entre 1971 et 2010. Une accélération de la fonte des glaciers est observée sur la période 1993-2009. Le niveau moyen des mers sur l'ensemble du globe a augmenté de $0,19 \pm 0,02$ m entre 1901 et 2010.

Le GIEC a établi quatre scénarii correspondant à des politiques environnementales envisageables. Ces scénarii ont été établis par comparaison du forçage radiatif de la surface du globe (W.m^{-2}) en 2100 par rapport à celui de 1750. Le scénario le plus optimiste, noté RCP 2.6 correspond à une augmentation du forçage radiatif de $2,6 \text{ W.m}^{-2}$ en 2100 en comparaison à 1750. Dans ce scénario il est à noter que la cinétique de ce forçage montre un pic puis une diminution. Deux scénarii intermédiaires RCP 4.5 (pour $4,5 \text{ W.m}^{-2}$) et RCP 6.0 (pour $6,0 \text{ W.m}^{-2}$) montrent une augmentation de cette capacité radiative et une stabilisation à l'horizon 2100 pour le scénario RCP 4.5. Le scénario le plus pessimiste, noté RCP 8.5 (pour $8,5 \text{ W.m}^{-2}$) montre une augmentation continue de la capacité radiative de la surface du globe.

Dans les quatre scénarii envisagés par le GIEC, la concentration de gaz à effet de serre de l'atmosphère augmente. La température globale de l'atmosphère, selon les simulations du RCP 2.6, augmente de $0,3$ à $1,7$ °C à l'horizon 2100 par rapport à la période 1986-2005. Selon le scénario le plus pessimiste, cette augmentation pour cette même période serait de l'ordre de $2,6$ à $4,8$ °C. Cet accroissement prévu de la température affecte de façon inégale les différentes régions du globe. Ceci aurait pour effet de modifier drastiquement le régime des pluies dans les latitudes moyennes en augmentant considérablement la quantité de précipitations.

L'augmentation observée et à venir de la température impacte les espèces vivantes et particulièrement les ectothermes (Hughes, 2000; Pörtner, 2001). Les effets de la température sont connus à différents niveaux. Au-delà des effets létaux, on distinguera ici les effets sublétaux (physiologiques, comportementaux et écodynamiques). Aux niveaux physiologique et génomique, une augmentation brutale de la température produit un effet génotoxique chez le carassin commun

Carassius auratus. Exposé à de fortes montées en température *C. auratus* développe des dommages à l'ADN, induit la production de micronoyaux ainsi que l'inhibition de la production cellulaire par inhibition de la division au cours de la métaphase (Anitha et al., 2000). Chez le poisson zèbre *Danio rerio*, l'augmentation de la température de 22 à 27 et 31 °C pendant la phase embryonnaire conduit au défaut d'expression des protéines contractiles ainsi que des protéines de structure des sarcomères. Ces défauts d'expression affectent le recrutement des fibres musculaires lors du développement (Johnston et al., 2009). De même que chez ces deux derniers poissons modèles, les effets de la température ont été étudiés sur l'esturgeon au niveau de l'expression génétique. Chez les larves d'esturgeon vert *Acipenser medirostris* exposées à une forte température (26°C), la surexpression de protéines heat-shock (HSP) a été montrée (Linares-Casenave et al., 2013). La surexpression de HSP 72, HSP 78 et HSP 60 est apparue directement liée à l'occurrence de courbures de la notochorde (Werner et al., 2007). De façon générale, la physiologie de l'ensemble des organismes est affectée par un changement de la température de son milieu (Hughes, 2000). Chez les poissons, cela se traduit par une modification des périodes de ponte et de reproduction (Pankhurst and Munday, 2011). Chez l'esturgeon sibérien *Acipenser baerii*, une diminution du succès à l'éclosion ainsi que des défauts de pigmentation des larves ont été observés (Park et al., 2013).

Une forte augmentation de la température peut induire des effets sublétaux. Ainsi, une réduction des performances natatoires des juvéniles d'esturgeon vert a été observée lorsque la température passe graduellement (1°C/j) de 19 à 24°C (Mayfield and Cech, 2004).

A l'échelle des populations l'effet de la température peut se traduire par une modification des aires de répartition de certaines populations de poissons (Ficke et al., 2007). Une modification de l'abondance et des zones utilisées a été constatée chez nombre d'espèces estuariennes et marines parmi lesquelles la morue *Gadus morua* et certains salmonidés (Roessig et al., 2004). La disparition de l'éperlan, *Osmerus eperlanus*, du bassin de GGD, qui représentait la limite sud de son aire de répartition, pourrait être une conséquence de l'augmentation des températures (Pronier and Rochard, 1998). Sur l'ensemble des 28 espèces de poissons diadromes rencontrées communément en Europe, Afrique du Nord et Moyen Orient, la modélisation montre une réduction de l'aire de répartition de 14 d'entre elles au cours du 21ème siècle en raison de l'augmentation des températures (Lassalle and Rochard, 2009). De même une modification de la capacité d'accueil des habitats de la rivière Hudson, du fait de la modification des températures et de la teneur en nutriment, est constatée sur l'esturgeon à museau court, *Acipenser brevirostrum* (Woodland et al., 2009).

2. Hypoxie

La fréquence et l'intensité des événements hypoxiques ont augmenté du fait du changement global (Rabalais et al., 2010). Depuis le début des années 1960, une augmentation exponentielle du nombre de zones à très forte hypoxie, dites « zones mortes », a été observée (Diaz, 2001; Diaz and Rosenberg, 2008). Selon Diaz (2001), l'hypoxie est le facteur déterminant de la distribution des espèces vivantes dans les zones côtières et estuariennes. Les zones mortes sont principalement présentes dans les régions fortement impactées par l'homme et où les fleuves charrient de grandes quantités de nutriments (Figure 5, page 32). Ces apports de sels nutritifs et de matières organiques créent des zones de forte eutrophisation dont la conséquence directe est une hypoxie. On dénombre plus de 400 systèmes aquatiques pour lesquels des épisodes de zones mortes ont été rapportés pour une surface totale concernée de plus de 245 000 km² (Diaz and Rosenberg, 2008). Dans la cinétique d'apparition d'une zone morte les premières espèces impactées par des mortalités de masse sont les espèces benthiques.

Selon Diaz et Rosenberg (2008), il ne fait aucun doute de la responsabilité de l'utilisation de fertilisants et d'énergies fossiles dans l'établissement de zones mortes. Si le changement climatique à lui seul réduit la quantité d'oxygène disponible dans l'eau en raison de l'augmentation de la température de surface (IPCC, 2007; IPCC, 2013), l'augmentation de la quantité de précipitation dans les zones tempérées sera de nature à augmenter la quantité de nutriments charriés par les fleuves. Une augmentation de 20% de la quantité d'eau charriée par le Mississippi induirait, selon les prévisions, une augmentation de 50% de la production primaire nette à son embouchure (Rabalais et al., 2010).

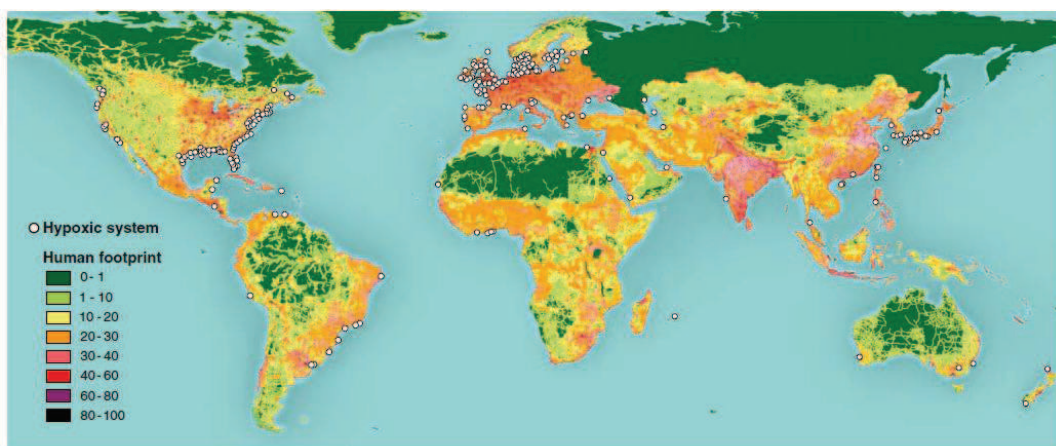


Figure 5 : Distribution globale des zones mortes rapportées par des études scientifiques (Diaz and Rosenberg, 2008).

L'hypoxie entraîne des effets délétères similaires à ceux induits par une augmentation de la température à plusieurs niveaux.

Au niveau individuel, des effets comportementaux, génomiques et tératogènes ont été relevés. Sur les embryons d'*Acanthopagrus butcheri*, une diminution de la survie et du taux d'éclosion lors de l'exposition à l'hypoxie a été rapportée (Hassell et al., 2008b). De même chez *Reinhardtius hippoglossoides*, aucune éclosion n'a été relevée lors d'une exposition à des conditions drastiques de réduction d'oxygène (Mejri et al., 2012). Chez les juvéniles de cette même espèce, l'exposition à des conditions hypoxiques semble réduire fortement les capacités métaboliques (Dupont-Prinet et al., 2013). Chez le bar commun *Dicentrarchus labrax*, une réduction de la cohérence du comportement anti-prédateur a été constatée en conditions hypoxiques (Lefrançois and Domenici, 2006; Domenici et al., 2007). Chez le poisson zèbre *Danio rerio*, l'hypoxie perturbe la migration des cellules germinatives primordiales par inhibition du facteur de croissance de l'insuline (Lo et al., 2011). Des modifications oxydatives du génome, ainsi qu'une réduction du taux de croissance ont été relevées chez la carpe commune *Cyprinus carpio* (Mustafa et al., 2011). Chez les premiers stades d'esturgeon, une réduction de la survie et de la croissance a été rapportée sur l'esturgeon atlantique *Acipenser oxyrinchus* (Secor and Gunderson, 1998b; Niklitschek and Secor, 2009).

En termes de population, un changement dans l'utilisation de l'espace par les larves de *Leptobiota curta* a été montré en cas d'hypoxie, conduisant ces derniers à venir en surface et donc à s'exposer à la prédation aviaire (Abe and Sakamoto, 2011). La diminution de la survie embryonnaire et du succès à l'éclosion constaté chez *Acanthopagrus butcheri* pourrait conduire à une baisse de la survie des jeunes stades (Hassell et al., 2008b). Chez les premiers stades d'esturgeon atlantique, il a été montré par modélisation que les habitats utilisables sont réduits sous conditions hypoxiques (Schlenger et al., 2013)

Au niveau écosystémique, une diminution de l'espace utilisable est observée pour les espèces pélagiques ainsi qu'une diminution de la production secondaire. Loin d'être anodine cette diminution de production secondaire se chiffre en milliers de tonnes de carbone (Diaz and Rosenberg, 2008).

Il est aujourd'hui bien établi que la température, de même que la salinité, interagit avec la saturation en oxygène de l'eau, renforçant l'impact de l'hypoxie sur la croissance et la survie chez le poisson (Fry, 1971; Claireaux and Lagardère, 1999; Niklitschek and Secor, 2005; Niklitschek and Secor, 2009). La modification combinée de ces deux facteurs environnementaux (température et oxygène) agit sur les poissons en modifiant leur physiologie (Pörtner, 2001), leurs aires de nourricerie, ainsi que leur schéma migratoire (Roessig et al., 2004).

C. Pollution du bassin de GGD

1. Notions générales sur les polluants

a. Définition de polluant chimique

Selon Ramade (2007), *"constitue une pollution toute modification anthropogénique d'un écosystème se traduisant par un changement de concentration des constituants chimiques naturels, ou résultant de l'introduction de substances chimiques artificielles ; toute perturbation du flux de l'énergie, de l'intensité des rayonnements, de la circulation de la matière ; toute altération d'une biocénose naturelle provoquée par une modification due à l'homme de l'abondance de certaines de ses espèces ou à la pullulation d'espèces exotiques introduites dans des habitats éloignés de leur aire d'origine"*. Le terme de polluant regroupe donc un ensemble de molécules de nature, d'action et de mode de dispersion variés. Du fait de la diversité des molécules concernées (plus de 100 000 substances chimiques d'usage courant en Europe, voir Figure 6, page 34), il est impossible de faire un point exhaustif de l'état de contamination d'un milieu (European Environment Agency, 2012). Ainsi nous nous concentrerons dans cette partie sur les molécules les plus répandues dans le bassin de GGD et qui ont fait l'objet d'études scientifiques.

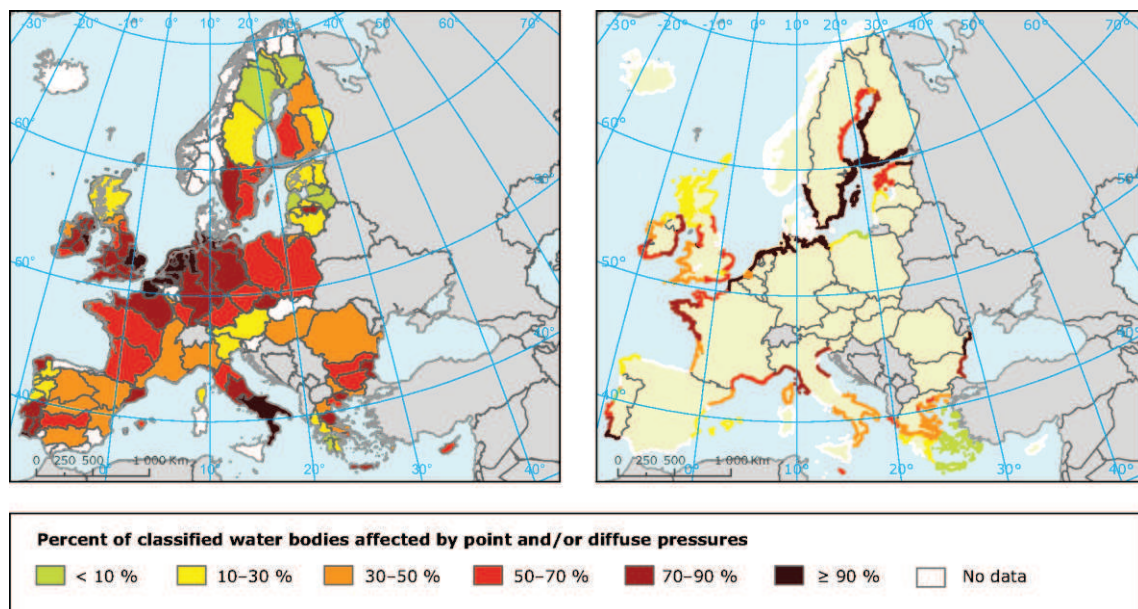


Figure 6 : Proportion des plans d'eau classés en différents bassins versants touchés par les pressions de pollution, pour (a) les rivières et les lacs et (b) les eaux côtières et de transition (European Environment Agency, 2012).

b. Notion de biodisponibilité d'un polluant

La notion de biodisponibilité décrit de nombreux procédés complexes, y compris le transfert de masse et l'absorption de contaminants dans les organismes. Elle est déterminée par les propriétés de la substance, du compartiment, la biologie des organismes et est également influencée par les conditions climatiques. La fraction biodisponible d'un contaminant représente la dose à partir de laquelle celui-ci pourra être intégré et/ou agir sur un organisme (Anderson and Hillwalker, 2008).

Des millions de composés organiques naturels ou de synthèse ont été dispersés dans l'environnement par la production de carburants, aliments, produits d'hygiène personnelle et d'autres produits manufacturés. A l'instar des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) et des PolyChloroBiphényles (PCBs) au sein d'un même groupe de produits chimiques, l'étendue des propriétés physico-chimiques est grande, de même que leur distribution dans l'environnement et donc leur biodisponibilité.

La forme chimique, ou spéciation, des contaminants inorganiques joue un rôle majeur dans leur biodisponibilité. Une propriété importante des métaux est leur capacité à se lier avec la matière organique, les cations et anions dans les eaux, les sols et les sédiments (Anderson and Hillwalker, 2008).

Dans les systèmes aquatiques, la fraction biodisponible est influencée par l'ensemble des paramètres de l'environnement, tels que le pH, les anions, la température, la teneur en oxygène et la teneur en carbone organique. Même le type de carbone organique, tels les acides fulviques et humiques, l'humine, le kérogène, le charbon, la suie, et le noir de carbone, affectent la distribution des contaminants et de la fraction biodisponible.

L'effet du temps sur la biodisponibilité d'un composé ne peut être négligé. Le vieillissement d'un contaminant dans des environnements en phase solide (sols et sédiments) modifie sa biodisponibilité. Les contaminants organiques et métalliques deviennent généralement moins biodisponibles avec le processus de vieillissement, car ils diffusent ou sont absorbés dans/sur les minéraux et matrices organiques dans les sols et les sédiments. Plus le contaminant est en contact avec un substrat tel que de la matière organique, plus ces processus se produisent aisément. Ainsi, à l'heure actuelle, la capacité de prévision des changements de biodisponibilité est faible car elle dépend de l'évolution dans le temps du site considéré.

c. Notions de bioconcentration, bioaccumulation et de bioamplification

Bioconcentration est définie comme la séparation d'un contaminant à partir de la phase aqueuse dans un organisme. Cela se produit lorsque l'absorption est supérieure à l'élimination. Une conséquence de stockage contaminant par un organisme est bioaccumulation (Gobas and Morrison, 2000). La bioaccumulation est l'enrichissement net d'un organisme en contaminants par rapport à sa présence dans l'environnement. C'est le résultat de l'ensemble des processus d'absorption, par la respiration et l'alimentation, et de perte par excrétion, diffusion passive ou transfert à la progéniture. Un contaminant absorbé par un organisme n'entraîne pas nécessairement une bioaccumulation dans celui-ci. L'organisme peut modifier le mélange de contaminant absorbé. Certains contaminants sont conservés tandis que d'autres, généralement hydrosolubles, sont éliminés (Borgå, 2013). Ce phénomène a été observé chez différentes espèces d'esturgeons à des stades variés de développement et pour divers contaminants. Chez les juvéniles d'esturgeon chinois *Acipenser sinensis*, l'exposition au plomb (Pb) a conduit à une accumulation de ce métal dans la peau, les branchies et le foie (Feng et al., 2010). Chez cette même espèce, Peng et al. (2012) ont montré une accumulation dans le cœur et un transfert dans les ovocytes d'un insecticide (le déchlorane). Le zinc (Zn), le cuivre (Cu) et le manganèse (Mn) ont montré un comportement similaire chez l'esturgeon perse *Acipenser persicus* (Mashroofeh et al., 2012). Il en va de même pour l'esturgeon étoilé *Acipenser stellatus* et l'esturgeon beluga *Huso huso* avec le cadmium (Cd), le Zn et le Pb (Mashroofeh et al., 2013).

Le terme de bioamplification est classiquement défini comme la condition pour laquelle la concentration d'un contaminant dans un organisme est supérieure à la concentration de celui-ci dans son alimentation quand la voie principale de contamination est l'alimentation. De façon générale la bioamplification est facilitée quand le contaminant est particulièrement hydrophobe. Ce phénomène a été étudié chez les juvéniles d'esturgeon blanc *Acipenser transmontanus* pour lesquels une bioamplification du mercure et du méthyl-mercure a été montrée dans divers tissus (Huang et al., 2012). A l'inverse, l'exposition d'esturgeons chinois *Acipenser sinensis* à l'ivermectin B1 par sons alimentation (insecticide naturel produit par les bactéries du genre *Streptomyces spp.*) n'a pas montré de bioamplification (Shen et al., 2005).

d. Synergie, antagonisme et additivité

Les principes théoriques de synergie, d'antagonisme et d'additivité d'effets dans un mélange de polluants sont aujourd'hui bien connus (Ferguson and Bingham, 1966). Selon le principe d'additivité, la toxicité de plusieurs composés en cocktail serait identique à la somme de

leur toxicité s'ils étaient seuls. L'antagonisme implique que la toxicité d'un composé en mélange serait moindre que sa toxicité à lui seul. Enfin, la synergie signifierait que la toxicité d'un composé en mélange augmente par rapport à sa toxicité s'il était seul (Verma et al., 1981).

Ces principes s'appliquent non seulement entre composés chimiques, mais également entre les composés et certaines variables environnementales comme le pH, la température, la matière organique ou encore la présence d'autres espèces biologiques (Burton Jr, 1991). Selon ce dernier auteur, l'étude combinée des paramètres environnementaux est la façon la plus efficace d'appréhender la toxicité d'un milieu à un instant donné.

2. *Ampleur de la contamination du bassin de GGD*

Les contaminants trouvés dans un bassin versant peuvent avoir deux origines :

- des contaminants naturellement présents dans un milieu, il s'agit essentiellement des métaux et des hydrocarbures issus de la combustion de la matière organique ;
- des contaminants d'origine anthropique, parmi lesquels on trouve les polluants organiques persistants (POPs) et les produits phytosanitaires et pharmaceutiques. Les contaminants d'origine anthropique sont des produits directs d'activités humaines ou des sous-produits issus de processus de fabrication, de transformation, ou de combustion.

On distingue plusieurs types de pollutions en fonction de leur récurrence et de leur intensité dans un milieu. Ainsi, on oppose la pollution aiguë, de courte durée et de forte intensité, à la pollution chronique, qui est permanente mais de faible intensité.

Si le bassin de GGD a longtemps été considéré comme une référence écologique pour les espèces ichtyologiques, cependant, celui-ci connaît de multiples contaminations et ce de longue date (Table 1, page 39 et Table 2, page 40) (Grousset et al., 1999; Durrieu et al., 2005; Maury-Brachet et al., 2008).

a. Les métaux

Depuis le début des années 70, on observe un nombre croissant de recherches dédiées à la contamination par les métaux (Saunders and Sprague, 1967; Hazel and Meith, 1970; McKim et al., 1974), en particulier à des doses sub-létales. Les effets interviennent à différents endroits et sur différentes fonctions de l'organisme. Bien que n'induisant pas directement la mort de l'animal, ils vont compromettre sa capacité de survie et/ou de reproduction (Robinet and

Feunteun, 2002). La contamination des poissons peut se faire par deux voies principales, l'absorption de polluants dissous dans l'eau et la voie trophique (Dallinger et al., 1987). Beaucoup de métaux sont fortement bioaccumulables (Ciardullo et al., 2008), à l'image du zinc, du cadmium ou de l'arsenic. Certains, comme le mercure ou le cadmium, induisent des effets tératogènes chez les stades précoces de poissons (Kammann et al., 2004; Billiard et al., 2008; Ismail and Yusof, 2011; Barjhoux et al., 2012), réduisent les taux de survie et d'éclosion (Kaur and Bajwa, 1987; Şişman et al., 2007; Soffientino et al., 2010a) et induisent des modifications du comportement (Couillard et al., 2011; Sloman and McNeil, 2012).

Dans le bassin de GGD, les métaux sont trouvés principalement sous forme particulaire en suspension dans l'eau et dans le sédiment. Une forte contamination au Cadmium (Cd) issue principalement de la rivière Lot (tributaire de la Garonne située à 222 km de l'embouchure) a été détectée dans les muscles de poissons locaux (*Rutilus rutilus*, *Abramis brama* et *Perca fluviatilis*) (Shinn et al., 2009) et estuariens (Durrieu et al., 2005). Ce métal est produit lors du processus de transformation du minerai de Zinc (Zn). De plus, on note dans l'estuaire de la Gironde une contamination par le zinc, le plomb ou encore le cuivre des particules en suspension du fait des traitements fongicides utilisés sur les vignobles des bassins versants amont (Kraepiel et al., 1997). Parmi les plus représentés on trouve le chrome, le cuivre et l'arsenic.

Contrairement à l'idée communément admise que les esturgeons forment un groupe très tolérants aux polluants, il a été démontré que la sensibilité au Cu des larves vésiculées d'esturgeon blanc est 1,8 et 4,6 fois plus forte que celle de la truite arc-en-ciel et du méné à tête de boule (*Pimephales promelas*) respectivement (Little et al., 2012; Vardy et al., 2013). Chez les juvéniles d'esturgeon chinois (*Acipenser sinensis*), il semble que le cuivre sous sa forme ionique (pour une concentration de 0,9 µg/L ou plus) ait une forte influence sur un certain nombre d'enzymes du métabolisme respiratoire (Zhang et al., 2011). Chez l'esturgeon perse, l'exposition au cadmium (0,68 mg/L) se traduit par une augmentation du cortisol et du glucose après seulement un jour d'exposition (Fateme et al., 2011).

Les concentrations en métaux relevées en amont et en aval d'une fonderie du fleuve Columbia (Colombie Britannique, Canada) n'induisent pas d'effets délétères chez les juvéniles d'esturgeon blanc, *Acipenser transmontanus* à 20-21 jours post fécondation (dpf) (Tompsett et al., 2014). Pour cette même espèce, et malgré des concentrations variable en calcium (entre 0,1±0,1 et 432±26 µg/L), la dose létale 50 (LC50) après une exposition aiguë (96 heures) à 8 et 40 jours post éclosion (dph) au Cu et au Pb s'étend respectivement de 9 à 25 µg Cu/L et de 177 à 1556 µg Pb/L. Pour le Cd, l'exposition de larves de 8 dph donne une LC50 de 14.5 µg/L (Vardy et al., 2014).

Table 1 : Récapitulatif des principaux polluants métalliques rencontrés dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne. L'origine des données est exprimée par les numéros (1) équipe TGM (Transferts Géochimiques des Métaux à l'interface continent océan) UMR EPOC (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux) Université de Bordeaux, (2) laboratoire LIENS (Littoral ENvironnement et Sociétés) Université de La Rochelle, (3) Agence de l'eau Adour-Garonne. MES : Matière en suspension.

| contaminant | compartiment | concentration | unité | Source | mesure |
|-------------|--------------|---------------|---------|--|----------------------------|
| Ag | eau | 0 | µg/L | paragrèze ; biocide agricole ; herbicide domestique | La Réole, suivi annuel (1) |
| | MES | 1.2 | µg/L | | La Réole, suivi annuel (1) |
| | sediment | 0.11 | µg/g ps | | La Réole, 2011 (2) |
| As | eau | 2.39 | µg/L | activité minière ; remobilisation de sédiment contaminé | La Réole, suivi annuel (1) |
| | MES | 25.5 | µg/L | | La Réole, suivi annuel (1) |
| | sediment | 10.7 | µg/g ps | | La Réole, 2011 (2) |
| Cd | eau | 0.04 | µg/L | activité minière ; remobilisation de sédiment contaminé | La Réole, suivi annuel (1) |
| | MES | 6.66 | µg/L | | La Réole, suivi annuel (1) |
| | sediment | 1.54 | µg/g ps | | La Réole, 2011 (2) |
| Co | eau | 0.13 | µg/L | Activité minière ; eaux de rejet urbaine | La Réole, suivi annuel (1) |
| | MES | 15.14 | µg/L | | La Réole, suivi annuel (1) |
| | sediment | 8.3 | µg/g ps | | La Réole, 2011 (2) |
| Cr | eau | 0.39 | µg/L | Activité minière ; eaux de rejet urbaine | La Réole, suivi annuel (1) |
| | MES | 115.9 | µg/L | | La Réole, suivi annuel (1) |
| | sediment | 23.7 | µg/g ps | | La Réole, 2011 (2) |
| Cu | eau | 1.03 | µg/L | activité minière ; remobilisation de sédiment contaminé ; fertilisation des cultures agricoles | La Réole, suivi annuel (1) |
| | MES | 86.9 | µg/L | | La Réole, suivi annuel (1) |
| | sediment | 20.1 | µg/g ps | | La Réole, 2011 (2) |
| Hg | MES | 0.16 | µg/L | Activité minière ; eaux de rejet urbaine | La Réole, suivi annuel (1) |
| | sédiment | 0.042 | µg/g ps | | Bourdelle, 2012 (3) |
| Mn | sediment | 649 | µg/g ps | Activité minière ; eaux de rejet urbaine | La Réole, 2011 (2) |
| Ni | eau | 0.56 | µg/L | activité minière ; remobilisation de sédiment contaminé | La Réole, suivi annuel (1) |
| | MES | 85.06 | µg/L | | La Réole, suivi annuel (1) |
| | sediment | 16.9 | µg/g ps | | La Réole, 2011 (2) |
| Pb | eau | 0.28 | µg/L | Activité minière ; eaux de rejet urbaine | La Réole, suivi annuel (1) |
| | MES | 85.25 | µg/L | | La Réole, suivi annuel (1) |
| | sediment | 25.8 | µg/g ps | | La Réole, 2011 (2) |
| Sr | eau | 102.6 | µg/L | Origine naturelle | La Réole, suivi annuel (1) |
| | MES | 140.1 | µg/L | | La Réole, suivi annuel (1) |
| Zn | eau | 5.67 | µg/L | activité minière ; remobilisation de sédiment contaminé | La Réole, suivi annuel (1) |
| | MES | 792.4 | µg/L | | La Réole, suivi annuel (1) |
| | sediment | 115 | µg/g ps | | La Réole, 2011 (2) |

Table 2 : Récapitulatif des principaux polluants organiques rencontrés dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne. L'origine des données est exprimée par les numéros (1) équipe LPTC (Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'environnement) UMR EPOC Université de Bordeaux et (2) Agence de l'eau Adour-Garonne.

| type | contaminant | compartiment | concentration | unité | Source | mesure |
|-------------|-------------------------|--------------|---------------|---------|---|--------------------------|
| pesticides | 2,4 D | eau | 48 | ng/L | Herbicide agricole | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| | 2,4 MCPA | eau | 82 | ng/L | Herbicide agricole | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| | Acétochlore | eau | 42 | ng/L | Herbicide agricole | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| | AMPA | eau | 115 | ng/L | Métabolite du glyphosate | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| | Artazine déséthyl | eau | 37.75 | ng/L | Herbicide agricole | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| | Bentazone | eau | 450 | ng/L | Herbicide agricole | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| | Glyphosate | eau | 220 | ng/L | Herbicide agricole et domestique | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| | Imidaclopride | eau | 230 | ng/L | Insecticide agricole | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| | Isoproturon | eau | 52 | ng/L | Herbicide agricole | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| | Métolachlore | eau | 620 | ng/L | Herbicide agricole et domestique | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| | Nicosulfuron | eau | 95.5 | ng/L | Herbicide agricole | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| | Oryzalin | eau | 130 | ng/L | Herbicide agricole | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| | Oxadiazon | eau | 28.5 | ng/L | Herbicide agricole et domestique | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| | Tebuconazole | eau | 33 | ng/L | Fongicide agricole | Saint Bazeille, 2012 (2) |
| HAP | Naphtalène | sédiment | 19 | µg/g ps | Insecticide industriel et domestique | La Réole, 2011 (1) |
| | Anthracène | sédiment | 12 | µg/g ps | Production industrielle | La Réole, 2011 (1) |
| | Phénanthrène | sédiment | 83 | µg/g ps | Production industrielle et militaire | La Réole, 2011 (1) |
| | Fluoranthène | sédiment | 138 | µg/g ps | Production industrielle | La Réole, 2011 (1) |
| | Pyrène | sédiment | 105 | µg/g ps | Production industrielle | La Réole, 2011 (1) |
| | Benzo(a)anthracène | sédiment | 53 | µg/g ps | Origine naturelle | La Réole, 2011 (1) |
| | Chrysène+triphénylène | sédiment | 81 | µg/g ps | Production industrielle | La Réole, 2011 (1) |
| | Benzo(a)pyrène | sédiment | 76 | µg/g ps | Produit de combustion | La Réole, 2011 (1) |
| | Benzo(e)pyrène | sédiment | 55 | µg/g ps | Produit de combustion | La Réole, 2011 (1) |
| | pérylène | sédiment | 21 | µg/g ps | Production industrielle | La Réole, 2011 (1) |
| | Benzo(x)fluoranthène | sédiment | 131 | µg/g ps | Origine naturelle | La Réole, 2011 (1) |
| | Dibenzo(x,x)anthracène | sédiment | 14 | µg/g ps | Produit de combustion | La Réole, 2011 (1) |
| | Benzo(g,h,i)pérylène | sédiment | 56 | µg/g ps | Production industrielle | La Réole, 2011 (1) |
| | Indéno(1,2,3,c,d)pyrène | sédiment | 58 | µg/g ps | Produit de combustion | La Réole, 2011 (1) |
| HAP alkylés | 2,1-d BNT | sédiment | 13 | ng/g ps | | La Réole, 2011 (1) |
| | Méthyl Naphthalène | sédiment | 24 | ng/g ps | Production industrielle | La Réole, 2011 (1) |
| | Méthyl Phenanthène | sédiment | 56 | ng/g ps | Production industrielle | La Réole, 2011 (1) |
| PCB | CB50 + CB28 | sédiment | 0.3 | ng/g ps | | La Réole, 2011 (1) |
| | CB52 | sédiment | 1 | ng/g ps | | La Réole, 2011 (1) |
| | CB101 | sédiment | 2.2 | ng/g ps | | La Réole, 2011 (1) |
| | CB118 | sédiment | 2 | ng/g ps | Production industrielle | La Réole, 2011 (1) |
| | CB153 | sédiment | 3.6 | ng/g ps | | La Réole, 2011 (1) |
| | CB138 | sédiment | 3.6 | ng/g ps | | La Réole, 2011 (1) |
| | CB180 | sédiment | 1.6 | ng/g ps | | La Réole, 2011 (1) |
| OCP | Lindane | sédiment | 0.1 | ng/g ps | Insecticide agricole et pharmaceutique | La Réole, 2011 (1) |
| | HCB | sédiment | 0.4 | ng/g ps | Fongicide agricole puis production industrielle | La Réole, 2011 (1) |
| | DDE+ dieldrine | sédiment | 2 | ng/g ps | Insecticide agricole | La Réole, 2011 (1) |
| | DDT | sédiment | 1.6 | ng/g ps | Insecticide agricole | La Réole, 2011 (1) |

b. Les polluants organiques persistants (POPs)

Les POPs comprennent, entre autre, les HAPs et les PCBs plus les pesticides organochlorés. Les HAPs peuvent provoquer de nombreux effets tel que des malformations

squelettiques (courbure de la queue), des œdèmes (péricardique ou du sac vitellin), des anémies, des hémorragies, des déformations de la tête, des yeux ou de la mâchoire et des perturbations du fonctionnement cardiaque chez le poisson zèbre *Danio rerio* lors d'une exposition aiguë à 10 mg/ml pendant 72h (Incardona et al., 2004). On retrouve des malformations de la mâchoire, des œdèmes péricardiques et du sac vitellin ainsi qu'une diminution de la capacité de nage chez le hareng du pacifique *Clupea pallasii* lors d'une exposition à du pétrole brut pendant 16 jours post fécondation (Carls et al., 1999). Des malformations oculaires et des courbures de la queue ont également été observées chez le saumon rose *Oncorhynchus gorbuscha* exposé à des graviers bitumineux (Heintz et al., 1999). A forte concentration (33,35ng/g de sédiment), le 4-nonylphénol induit une altération de l'activité cardiaque et du succès à l'éclosion chez le médaka *Oryzias latipes* (Vicquelin et al., 2011). En mélange et dans les concentrations environnementales, les HAPs sont également responsables chez le médaka de retards à l'éclosion, de malformations squelettiques et cardiaques, de perturbations de l'activité natatoire et de dommages à l'ADN (Le Bihanic et al., 2014b; Le Bihanic et al., 2014a). Il en est de même pour le benzo[a]anthracène (Le Bihanic et al., 2015) ou le pyrène et le méthylpyrène (Barjhoux et al., 2014) qui induisent des dommages à l'ADN. Outre les effets embryotoxiques et tératogènes, les HAPs sont aussi des mutagènes, des cancérogènes, des composés immunotoxiques et des perturbateurs endocriniens.

Les PCBs sont des molécules exclusivement de synthèse constituées de deux groupements phényles pouvant être substitués par 1 à 10 atomes de chlore. Ils étaient utilisés dans les transformateurs et les condensateurs électriques (Figure 7, page 42), les matières plastiques ou encore les revêtements (Dargnat and Fisson, 2010). Bien qu'interdits de commercialisation et d'utilisation en France depuis 1987, leur rémanence les rend encore aujourd'hui détectables dans l'environnement. La présence de chlore dans ces composés les rend persistants dans l'environnement (estimation d'une demi-vie de 38 ans pour le PCB 180, de 18,8 ans pour le PCB 153 et de 10 ans pour le PCB 126 dans les sédiments de la mer Baltique en déchloration anaérobie (Sinkkonen and Paasivirta, 2000)). Le PCB 153 est le plus fréquemment retrouvé dans le milieu naturel du fait de son importante utilisation dans l'industrie. Ce PCB est faiblement toxique et peu métabolisable. Le PCB 126 est peu présent dans l'environnement mais est un de ceux qui provoquent le plus d'effets. Soffientino et al. (2010b) ont montré que le PCB 126 induit des retards à l'éclosion et des malformations. Cannas et al. (2013) ont également montré qu'un cocktail de PCB à forte concentration (2240 ng/g de nourriture) et pendant une exposition longue (entre 30 et 60 jours) peut induire des effets sur le métabolisme des juvéniles de sole commune *Solea solea*. Le PCB 126 dans des concentrations modérées induit, chez le médaka japonais, des malformations squelettiques, des changements dans l'activité cardiaque ou encore un retard à

l'éclosion (Vicquelin et al., 2011). Ce même composé est également connu pour modifier le comportement de prédation chez *Fundulus heteroclitus* (Couillard et al., 2011).



Figure 7 : Transformateur électrique contenant un mélange de PCBs (pyralène) situé sur la Dordogne au barrage de Bergerac.

Le bassin de GGD abrite des espèces de poissons fortement contaminées par des PCBs, comme par exemple l'anguille, *Anguilla anguilla*, et le flet, *Platichthys flesus*, (Daverat et al., 2011; Tapie et al., 2011). Parmi les POPs Bodin et al. (2014) ont enregistré une contamination en PCB chez six espèces de poisson de l'estuaire de la Gironde ce qui implique la présence de ces polluants dans l'estuaire. Les trois principaux PCBs bioaccumulés sont les PCBs 153, 138 et 180 et ce quels que soit l'espèce et le tissu étudié. Par ailleurs, Budzinski et al. (1997) ont observé une pollution aux HAPs dans les sédiments de Gironde. Les composés les plus représentés sont le fluoranthène, le pérylène, le pyrène, et le benzo(a)pyrène.

De la même manière que pour les métaux, il semble que les acipenséridés présente une forte sensibilité à certains POPs. Chez les juvéniles de beluga (*Huso huso*), l'exposition durant 48 heures à des doses croissantes de pétrole brut (de 0 à 1000 ppm) montre une augmentation significative de certains indicateurs biochimiques comme le glucose, les triglycérides, le calcium et le taux de protéines (Jahanbakhshi and Hedayati, 2013). Chez deux espèces d'esturgeons de la rivière Hudson, dans l'état de New-York (*Acipenser brevirostrum* et *Acipenser oxyrinchus*), l'exposition au PCB126 semble induire de multiple effets délétères comme une réduction de la survie embryonnaire, une modification des caractéristiques morphométriques et des défauts de développement des yeux (Chambers et al., 2012).

c. Les produits phytosanitaires, pharmaceutiques et vétérinaires

L'un des pesticides le plus souvent retrouvé dans les eaux de rivière du bassin de GGD est l'AMPA (acide aminométhylphosphate), métabolite du glyphosate (Table 2, page 53). Le second pesticide le plus souvent détecté dans les rivières du bassin est le S-métolachlore. On trouve également des substances pharmaceutiques telles que la carbamazépine (rapport liteau 2003). Il a aussi été relevés des composés stéroïdiens connus pour leur pouvoir de perturbateur endocrinien comme le bisphénol A et le nonylphénol.

Parmi les produits phytopharmaceutiques, le glyphosate est l'herbicide le plus utilisé dans le monde (Giesy et al., 2000), que ce soit en agriculture ou en désherbage urbain (voirie, jardin amateur, ...). Son métabolite majoritaire, le plus souvent détecté dans les eaux, est l'AMPA. Ce dernier est produit principalement lors de la biodégradation bactérienne du glyphosate¹. Le Roundup® est connu pour provoquer une inhibition de l'activité de l'AchE (acétylcholine estérase) dans le cerveau du boga *Leporinus obtusidens*, ainsi qu'une altération du métabolisme lors d'une exposition aiguë dès 3mg/L (Glusczak et al., 2006). Modesto et Martinez (2010) ont également mis en évidence un stress oxydant (avec une stimulation de la voie de biotransformation et une tendance à la peroxydation lipidique) chez des juvéniles de *Prochilodus lineatus* exposés à une concentration de 10mg/L. Filizadeh et Islami (2011) ont montré que pour des juvéniles de plusieurs espèces d'esturgeons (*Huso huso*, *Acipenser stellatus*, et *Acipenser persicus*), le Roundup® provoque une augmentation du taux métabolique avec des effets négatifs sur la survie (respectivement pour des concentrations de 26,4; 23,2 et 27,5 mg/L). Selon Shaner et al. (2006) le pouvoir herbicide de la préparation est dû au S-métolachlore. Le S-métolachlore provoque une embryotoxicité, des dommages à l'ADN, des malformations et un stress oxydant chez les larves d'huître creuse *Crassostrea gigas* et ce à des concentrations rencontrées dans l'environnement (0,01µg/L) (Mai et al., 2012; Mai et al., 2013; Mai et al., 2014).

Les produits pharmaceutiques et vétérinaires les plus retrouvés dans le bassin de GGD sont la carbamazépine, l'ibuprofène, le paracétamol, le fipronil (Kümmerer, 2009). Van den Brandhof et Monforts (2010) ont démontré que la carbamazépine, à une concentration de 86,5mg/L, provoque une embryotoxicité chez le poisson zèbre *Danio rerio*. Il a été aussi retrouvé des composés stéroïdiens connus pour leur pouvoir de perturbateur endocrinien comme le bisphénol A qui provoque des retards d'éclosion pour des embryons de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* à une concentration de 30 µg/mL (Aluru et al., 2010) et le nonylphénol qui

¹ Commercialisé sous la marque Monsanto et la licence Roundup

induit des effets tératogènes chez le poisson chat *Heteropneustes fossilis* dès 0,1 µg/L (Chaube et al., 2013).

III. Enjeux et objectifs de cette étude

A. Enjeux de la thèse

A l'heure actuelle, la population d'esturgeon européen du bassin de GGD est soutenue par un plan d'action européen décliné règlementairement en France (Ministère de l'écologie et du développement durable, 2011) et en Allemagne (Rosenthal et al., 2007; Gessner et al., 2010). Un long travail de recherche initié par IRSTEA au début des années 1980 a permis de maîtriser la reproduction de cette espèce. Une première reproduction assistée en 1995 a donné lieu à un premier lâcher en milieu naturel de jeunes stades ainsi que la constitution d'un stock captif en France (station d'expérimentation de Saint-Seurin sur l'Isle) (Williot et al., 2011c) et en Allemagne sous l'égide de l'IGB (institut des eaux douces de Berlin) (Kirschbaum et al., 2011). Depuis 2007, et la première maturation d'esturgeons européens maintenus en captivité, la reproduction et l'élevage des jeunes stades de cette espèce semblent maîtrisés (Chèvre et al., 2011; Williot and Chèvre, 2011). Depuis, plus de 1,6 million de jeunes stades (de la larve de cinq jours, constituant l'immense majorité des lâchés, au juvénile d'un an) ont été relâchés en Dordogne et en Garonne.

1. Retour de géniteurs

La reproduction et le repeuplement sont aujourd'hui relativement bien maîtrisés. Sur la base de leur cycle de vie, les esturgeons lâchés en 1995 et chaque année à partir de 2007 sont supposés revenir dans le bassin de GGD dans les années à venir. Il est donc essentiel, dans le cadre du plan d'action européen, de savoir si les embryons issus d'une reproduction naturelle d'esturgeon européen rencontreront des conditions satisfaisantes à leur survie et leur développement. Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents sur nombre d'espèces piscicoles notamment chez les esturgeons, la température, la concentration en oxygène et en polluants peuvent représenter des freins à la survie des jeunes stades qui sont particulièrement vulnérables. La connaissance des seuils critiques et de tolérance de l'espèce à ces trois pressions environnementales permettrait de mieux appréhender les chances de survie d'individus nés en milieu naturel ou relâchés à de très jeunes stades.

2. Transposition des résultats à d'autres bassins versants

L'esturgeon européen est une espèce longévive dont la durée de vie peut atteindre plus de 100 ans. Dans le contexte du changement climatique, les conditions qu'un animal a connues à l'éclosion ne sont pas nécessairement celles que ses embryons subiront. Les données obtenues lors de ce travail pourraient être transposés à d'autres bassins versants.

De plus, des actions de repeuplement sont menées en Allemagne par des lâchers de jeunes stades produits à partir du stock captif de Saint-Seurin sur l'Isle. Ces jeunes stades sont relâchés sur l'Elbe où les conditions sont très différentes de celles du bassin de GGD. Les données recueillies lors de ce travail pourraient permettre de cibler les actions de repeuplement menées au niveau des bassins versants au sein desquels la possibilité de survie est la plus forte.

B. Objectifs de la thèse

Ce travail a pour objectif de déterminer la sensibilité des jeunes stades d'esturgeon européen aux fluctuations des facteurs environnementaux auxquels ils pourraient être soumis dans les conditions actuelles ou dans un futur proche. Trois paramètres environnementaux ont été pris en compte :

1- La température, connue pour influencer l'ensemble des ectothermes et être une variable déterminante de leur survie. Jusqu'ici les connaissances sur l'influence de la température sur l'esturgeon européen se basaient sur des observations empiriques n'ayant pas fait l'objet d'études particulières.

2- L'oxygène, connu pour influencer particulièrement les premiers stades de développement de poissons. De même que pour la température, les connaissances dans ce domaine se basaient sur des observations de juvéniles d'esturgeon de quelques mois, connus pour être plutôt tolérants à la diminution de la disponibilité en oxygène que les stades plus jeunes.

3- Les polluants, nombreux dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne. Leur implication dans la disparition de l'espèce a souvent été évoquée mais jamais démontrée.

Le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne a été choisi pour trois raisons majeures : (i) il accueille la dernière population d'esturgeon européen, (ii) c'est dans ce bassin qu'un important effort de repeuplement est réalisé depuis 1995 et (iii) c'est ce bassin qui devrait accueillir la prochaine reproduction naturelle d'esturgeon européen.

Ce travail comprend deux volets principaux (i) l'étude de la vulnérabilité et de la sensibilité des stades embryo-larvaires à la pollution et à deux facteurs physiques clés du

milieu : le taux d'oxygène et la température de l'eau et (ii) l'étude de la qualité des frayères historiques de l'espèce.

Ce document est découpé en 6 chapitres. Après une explication des choix méthodologiques et de la démarche utilisée dans cette étude (Chapitre 1), un premier article, soumis dans *Journal of Fish Biology*, évalue la sensibilité des embryons et des larves d'esturgeon européen à la température et la saturation en oxygène du milieu. Cette étude est complétée par un second article, publié dans *Journal of Applied Ichthyology* (Delage et al., 2014), qui évalue l'impact de l'âge sur cette sensibilité. L'évaluation de la qualité des sédiments de frayère est ensuite réalisée au moyen d'une espèce modèle (Chapitre 5), le médaka japonais *Oryzias latipes*, dont l'utilisation comme proxy de l'esturgeon européen a été validé (Chapitre 4). Un sixième chapitre présente l'étude de la sensibilité des embryons et des larves d'esturgeon européen aux polluants qu'il est susceptible de rencontrer dans le bassin Gironde-Garonne-Dordogne. Enfin, ce document se referme sur la possibilité d'utiliser les connaissances acquises au cours de cette étude, sur les bassins versants où l'esturgeon européen était historiquement présent.

CHAPITRE 1 : DEMARCHE ET CHOIX

METHODOLOGIQUES

Des conditions réalistes du point de vue environnemental ont été utilisées tout au long de ce travail. L'étude de la sensibilité thermique et oxique, ainsi que la sensibilité aux polluants, se base sur les conditions actuelles et des projections réalistes. La sensibilité à ces trois facteurs est évaluée de façon indépendante et combinée.

I. Evaluer la tolérance de l'esturgeon vis-à-vis de la température et de l'oxygène

A. Etablir les conditions expérimentales

Afin d'établir des conditions d'exposition réalistes, la première étape de ce travail a consisté à collecter les données disponibles de température et de saturation en oxygène de la masse d'eau sur les zones de frayère pendant la période de reproduction de l'esturgeon (Figure 8, page 48).

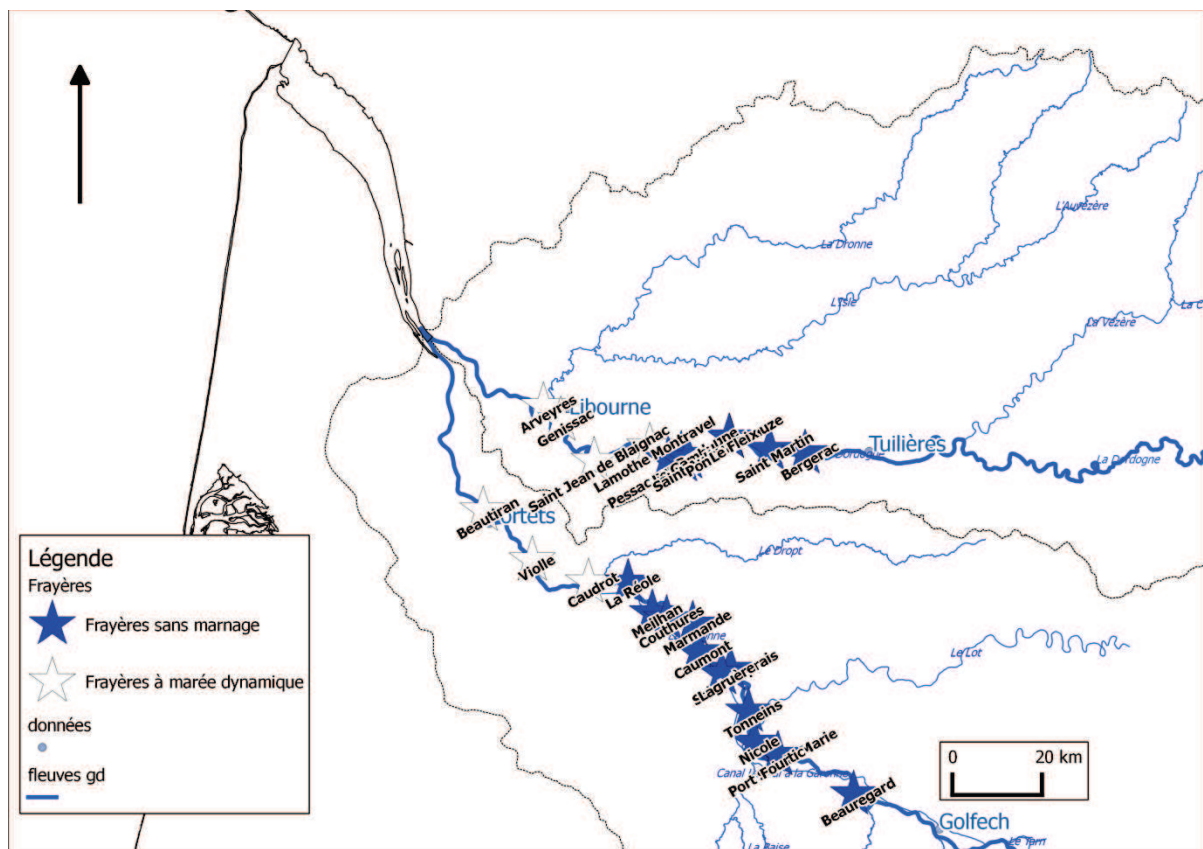


Figure 8 : Localisation de la zone d'étude. Les frayères en zone de marée dynamique sont symbolisées par des étoiles blanches. Les étoiles bleues symbolisent les frayères non influencées par les marées. Les points bleus localisent les lieux de relevés de température et d'oxygène.

Le réseau de surveillance MAGEST (Réseau de surveillance automatisée du système estuarien Garonne - Dordogne - Gironde) nous a permis d'accéder à des données de température et de saturation en oxygène sur la partie aval des rivières (Portets sur la Garonne et Libourne sur la Dordogne). L'association MIGADO (Migrateur Garonne Dordogne) nous a permis d'obtenir des relevés de températures sur la partie amont de la zone d'étude (Golfèch en Garonne et Tuillières en Dordogne). Des moyennes journalières ont été établies en se concentrant sur les mois de mai et juin correspondant à la période de reproduction "historique" de l'esturgeon européen.

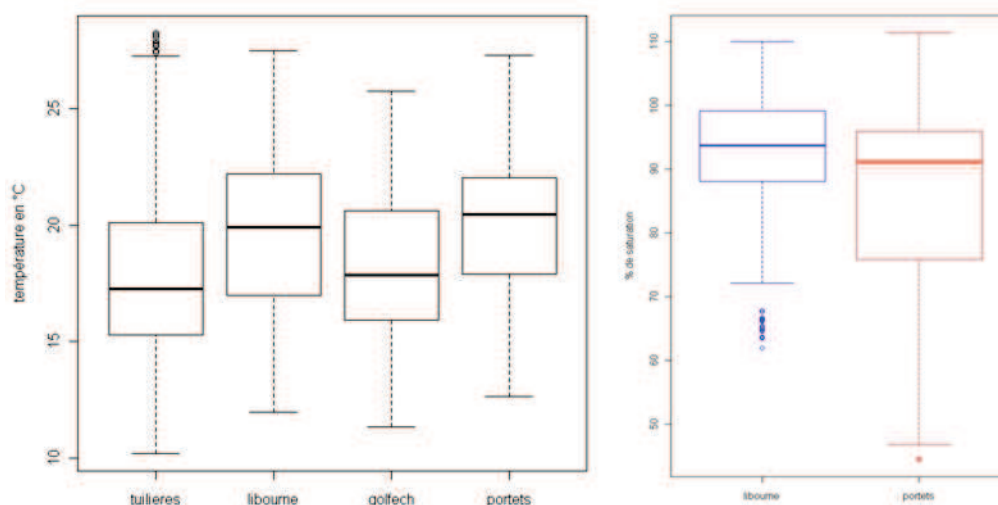


Figure 9 : Dispersion des températures moyennes journalières (gauche) et des saturations moyennes en oxygène (droite) sur les sites de relevés. Les températures (en moyenne journalière) médianes, premier et troisième quartile ainsi que minimales et maximales sont représentées sur ce schéma.

Le choix des températures et des conditions d'oxygène à tester a été basé sur la distribution des valeurs observées (Figure 9, page 49). En ce qui concerne les conditions thermiques, sur les quatre relevés disponibles, les minima se situaient autour de 12 °C, le premier quartile autour de 16 °C, la médiane à 20 °C, le troisième quartile autour de 23°C et le maximum proche de 26°C. De la même manière, le choix des conditions oxiques nous a permis d'établir les modalités à tester à savoir : 90 % de saturation en oxygène (% O₂ sat) correspondant à des conditions normoxiques, 70 % O₂ sat correspondant au premier quartile et 50 % O₂ sat correspondant au minimum.

Afin d'envisager les effets du changement global, un scénario d'augmentation des températures et de réduction de la disponibilité en oxygène du milieu a été établi. Sur la base du rapport du GIEC (2007), une augmentation de 4 °C des températures maximales (condition 30 °C)

et une saturation en oxygène minimale rencontrée dans le bassin de GGD (condition 30 % O₂ sat) ont été fixées.

B. Développement d'un dispositif d'exposition des embryons et larves d'esturgeon

L'exposition aux conditions souhaitées a nécessité la mise en place de systèmes expérimentaux spécialement conçus afin de répondre aux exigences de l'espèce et aux besoins de l'expérimentation. Un protocole de fécondation in vitro a été établi pour permettre la fécondation optimale d'un faible nombre d'ovocytes. Il a fallu prendre en compte les spécificités des œufs d'esturgeon. L'embryon d'esturgeon européen devient adhérent 4 à 6 minutes après la fécondation. De plus, un embryon mort développe rapidement une saprolégnose qui se transmet aux embryons alentours. Ainsi, après fécondation les embryons ont été rapidement déposés sur une grille en acier inoxydable et séparés les uns des autres.

Afin d'éviter une hypoxie localisée autour des embryons du fait de leur propre consommation d'oxygène et de s'assurer que les embryons soient bien dans les conditions désirées, une arrivée d'eau par le dessous de l'incubateur a été mise en place (Figure 10, page 50).

Les conditions expérimentales ont été établies et contrôlées automatiquement en amont par un automate industriel. L'approvisionnement en eau a été assuré par des pompes péristaltiques permettant de maintenir un débit identique et constant durant toute l'expérimentation (Figure 11, page 51).

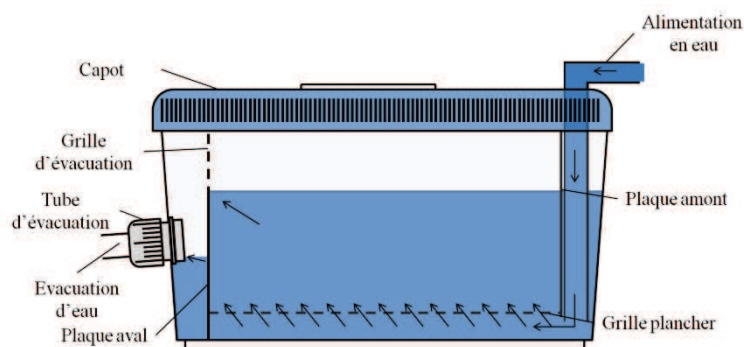


Figure 10 : Schéma de principe d'un incubateur destiné à l'élevage d'embryon d'esturgeon européen pouvant contenir jusqu'à 300 individus. L'incubateur mesure 18 cm de longueur, 12 cm de largeur et 12 cm de hauteur il est constitué de PETG. Le volume de l'incubateur est de 1 litre. Les flèches indiquent le sens de circulation de l'eau.

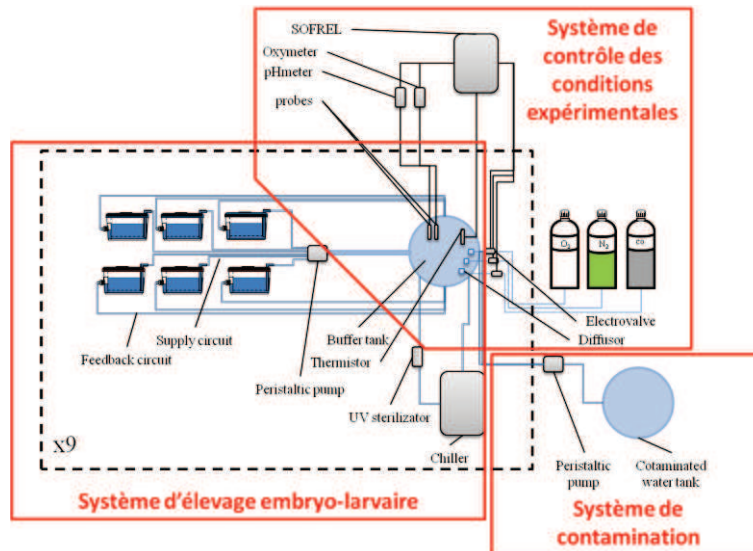


Figure 11 : Schéma de principe du système d'exposition des embryons d'esturgeon.

Les embryons utilisés lors des différentes expérimentations ont été obtenus à partir d'un groupe de 54 géniteurs élevés en captivité à la station d'expérimentation de Saint-Seurin-sur-l'Isle. Les conditions physico chimiques des bassins d'élevage des géniteurs sont régulées et vérifiées quotidiennement. Les variations de température simulent les variations observées dans le milieu naturel.

C. Différents niveaux d'intégration

Afin d'avoir une vue la plus large possible des effets biologiques produits, nous nous sommes appuyés sur plusieurs niveaux d'intégration biologiques de l'analyse moléculaire au comportement.

L'analyse moléculaire a consisté en l'évaluation des dommages à l'ADN grâce au test des comètes (Singh et al., 1988). Ce test révèle les lésions primaires à l'ADN qui peuvent être induites par une exposition à de fortes températures, une diminution de l'oxygène ainsi que la contamination par des polluants.

Au niveau phénotypique, des analyses biométriques des différentes parties du corps ont été faites (taille totale, taille de la tête et surface du sac vitellin) afin de vérifier l'impact des conditions imposées sur le développement embryonnaire. De la même manière, une évaluation de la nature et de l'importance des malformations a été menée (malformations squelettiques, craniofaciales, oculaires, cardiaques et vitellines).

Certains traits d'histoires de vie comme la survie (embryonnaire et larvaire) et l'éclosion (succès et temps de développement) ont été observés afin d'établir des valeurs de références et déterminer l'impact des conditions expérimentales testées.

Une mesure de l'activité natatoire par l'analyse de la vitesse de nage en conditions non stressantes a été réalisée. En effet, ni les stress physiques (chute d'objet et vibration mécanique), ni les stress lumineux (flash intense court ou long) n'ont eu d'impact significatif sur le comportement des larves d'esturgeons.

L'évaluation du métabolisme global par respirométrie a été faite en groupant les individus par 10. Cette évaluation a permis d'établir des valeurs de base (pour les témoins) et des données en conditions de stress de la consommation en oxygène au niveau individuel.

D. Evolution de la sensibilité avec l'âge

Si la phase embryo-larvaire est une période critique du fait de la forte sensibilité des individus à la température et à l'oxygène, la traversée du bouchon vaseux (zone de la partie basse de la Garonne et de la Dordogne caractérisée par une forte concentration en particules et où la concentration en oxygène atteint fréquemment des niveaux faibles) par les juvéniles d'esturgeon européen lors de sa migration vers l'estuaire au cours de leur premier hiver en est une autre. En effet, le bouchon vaseux est à l'origine de fortes diminutions de la concentration en oxygène. Dans le but d'évaluer la capacité des jeunes stades d'esturgeons aux conditions environnementales, une analyse de la sensibilité des juvéniles de trois mois (âge auquel ils passent par le bouchon vaseux en milieu naturel) a été réalisée.

II. Evaluer la qualité des sédiments de frayères

A. Etat de contamination des frayères a priori

Selon Jégou et al. (2002), le bassin de GGD compte 28 frayères potentielles ou avérées, 15 sur la Garonne et 13 sur la Dordogne. Ainsi, une évaluation de la qualité de chaque frayère a été établie en se basant sur la quantité, l'importance et le type de rejet industriel et domestique. Des données ont été collectées auprès de l'agence de l'eau Adour-Garonne sur les rejets industriels et domestiques du bassin de GGD. Intégrés à un SIG (QuantumGIS) seuls les rejets situés dans les 5 kms autour des grands cours d'eau du bassin de GGD ont été pris en compte (Figure 12, page 53 et Figure 13, page 54). Les indices METOX² et DBO₅³ ont été utilisés pour évaluer

respectivement la contamination aux métaux et aux polluants organiques. De cette façon, 11 frayères ont été sélectionnées, 6 sur la Garonne et 5 sur la Dordogne (

Table 3, page 53).

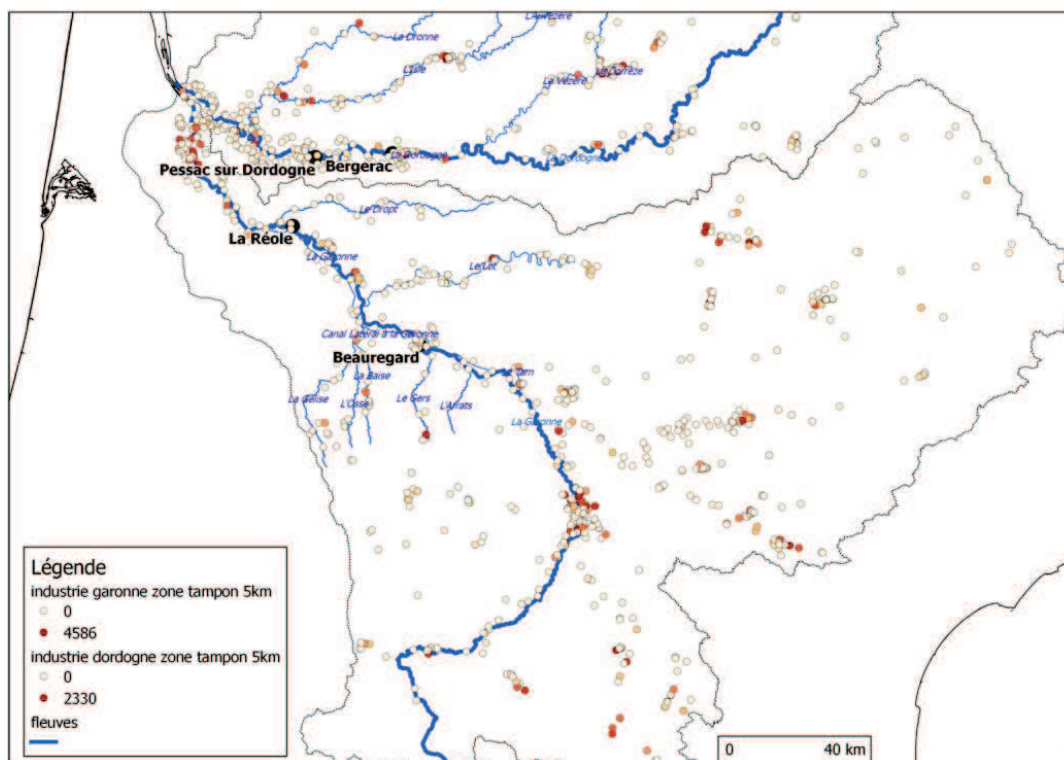


Figure 12 : Localisation des rejets industriels en Garonne et Dordogne dans les 5 kms autour des grands cours d'eaux du bassin de GGD. La couleur des rejets correspond à l'indice METOX² (metox/an) utilisé par les agences de l'eau, les points pour lesquels aucune donnée n'a été récoltée n'ont pas été figurés sur la carte. Les quatre sites choisis délimitent la zone dans laquelle des frayères potentielles (hors marée dynamique) ont été relevés.

Table 3 : Liste des 11 sites sélectionnés classés par rivière et distance à la mer. La raison ayant poussé au choix du site est notée dans la colonne de droite.

| Rivière | Site | Distance à la mer (km) | coordonnée X RGF93 | coordonnée Y RGF93 | Raison du choix |
|----------|-----------------------|------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------------|
| Garonne | Violle | 148 | 438541,55 | 6396130,53 | Zone de marée dynamique |
| Garonne | La Réole | 169 | 459572,16 | 6391359,09 | Site aval |
| Garonne | Saint Caprais | 216 | 482112,2 | 6372177,97 | Nombre de rejet important |
| Garonne | Tonneins | 222.5 | 486072,4 | 6368957,35 | Confluence du Lot et de la Garonne |
| Garonne | Nicole | 232 | 487443,45 | 6362035,87 | Nombre de rejet faible |
| Garonne | Beauregard | 270 | 509331,76 | 6344929,07 | Site amont |
| Dordogne | Saint Jean de Blagnac | 148 | 452119,03 | 6417806,3 | Zone de marée dynamique |

² Indice global calculé à partir des concentrations en métaux et métalloïdes, pondérées par des coefficients multiplicateurs en fonction de leur degré de toxicité, selon les normes Afnor T 90-112, T 90-113 et T 90-119 (en métox/jour pour les rejets). Cet indice est établi par les Agences de l'eau afin de percevoir les redevances de pollution.

| | | | | | |
|-----------------|---------------------|-------|------------|------------|---------------------------|
| Dordogne | Pessac sur Dordogne | 169.2 | 468476,34 | 6417855,65 | Site aval |
| Dordogne | Saint Aulaye | 175.5 | 472718,71 | 6418536,89 | Nombre de rejet important |
| Dordogne | Pont de Beauze | 182 | 481937,88 | 6422983 | Nombre de rejet faible |
| Dordogne | Bergerac | 211 | 498551,476 | 6419579,31 | Site amont |

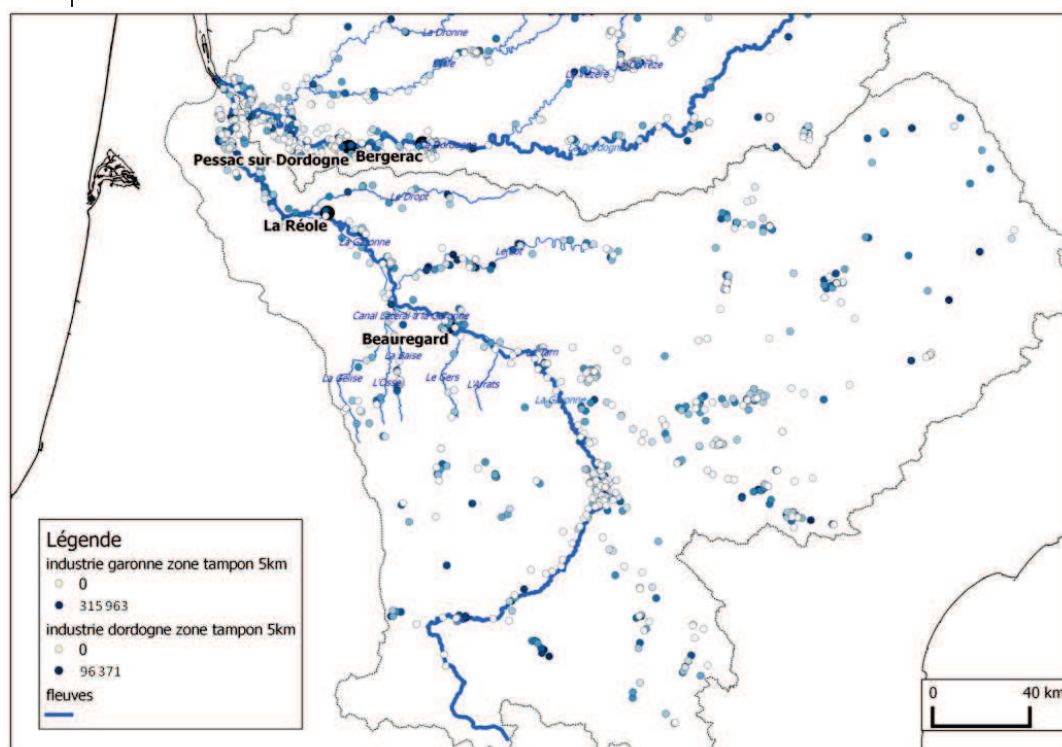


Figure 13 : Localisation des rejets industriels en Garonne et Dordogne dans les 5 kms autour des grands cours d'eaux du bassin de GGD. La couleur des rejets correspond à l'indice DBO₅³ (kg/an) utilisé par les agences de l'eau, les points pour lesquels aucune donnée n'a été récoltée n'ont pas été figurés sur la carte.

B. Collecte de sédiments

Sur chacun des 11 sites sélectionnés, des prélèvements de sédiment, d'eau et de biofilm ont été réalisés afin de caractériser la toxicité du milieu. Les prélèvements de sédiment ont été effectués durant l'été 2012 au moyen d'une boîte à griffes qui ont été ensuite tamisés afin de récolter uniquement la fraction inférieure ou égale à 2 mm (Figure 14, page 55) afin de se placer dans des conditions optimale pour les tests de toxicité embryo-larvaire. Trois prélèvements de sédiments ont été effectués au milieu de la rivière pour chaque site en utilisant une embarcation (Zodiac, EXO7) puis ils ont été mélangés et 50 g de sédiments ont été conservés et congelés à -20 °C.

³ Demande biologique en Oxygène au bout de 5 jours. La DBO₅ est la quantité d'oxygène nécessaire aux micro-organismes présents dans un milieu pour oxyder (dégrader) les substances organiques contenues dans un échantillon d'eau maintenu à 20° et dans l'obscurité, pendant 5 jours.

Trois échantillons de biofilm (Figure 15, page 55) ont été collectés en frottant des galets au moyen d'une brosse à dent (différente pour chaque site), conservés dans l'eau du site dans une bouteille nalgène et congelés à -20°C dès le retour en laboratoire et jusqu'au moment de la réalisation des différentes analyses. De même trois prélèvements de 500 mL d'eau ont été effectués en bouteille nalgène et congelés à -20°C au retour en laboratoire. Les paramètres physico-chimiques ont également été relevés sur chaque site (température, oxygène, pH, conductivité, salinité et position géographique RGF 93).



Figure 14 : Boîte à griffes utilisée lors des prélèvements de sédiment sur les frayères.



Figure 15 : Biofilm sur les galets d'une frayère d'esturgeon européen, site de Saint Caprais (Garonne).

C. Remplacer l'esturgeon par un modèle, est ce faisable ?

La réalisation de tests embryo-larvaire de toxicité sur les 11 sites de l'étude en utilisant exclusivement l'esturgeon européen comme modèle, présente un grand nombre de contraintes (une seule reproduction par an, système de grande taille et difficile à mettre en œuvre). Ainsi l'évaluation de la qualité des frayères se base ici sur la validation et l'utilisation d'un test de toxicité embryo-larvaire de substitution sur un poisson modèle utilisé couramment en toxicologie, le médaka japonais, *Oryzias latipes*, couramment utilisé dans les tests de toxicité par sédiment contact. Il est supposé que les sédiments des sites amonts présentent une toxicité moindre que les sites avals et que la Dordogne est moins contaminée que la Garonne. Des tests de toxicité sur embryons de médaka japonais en parallèle de tests sur embryons d'esturgeon ont été réalisés sur 4 sédiments de frayères récoltés en 2013 (La Réole et Pessac-sur-Dordogne en aval de la Garonne et de la Dordogne respectivement et Beauregard et Bergerac en amont).

Les mêmes critères d'évaluation de la toxicité ont été utilisés pour les deux espèces (voir Chapitre 1.I.C page 51).

D. Test MELAc

Suite à la validation de l'utilisation du médaka japonais en remplacement de l'esturgeon européen, la toxicité des 11 sédiments de frayères a été mesurée au moyen du test embryo-larvaire médaka. Le test MELAc (medaka embryo larvae assay in sediment contact) dure environ 14 jours à 26°C. Une journée avant le début du test, le sédiment est placé dans les conditions de l'expérimentation. Chaque jour la totalité de l'eau est renouvelée au moyen d'un propipette. Les embryons sont incubés à 26 °C dans des boîtes de pétri de 4 cm de diamètre au fond desquelles est disposé le sédiment à tester (Figure 16, page 57). La phase embryonnaire dure environ 9 jours et la phase larvaire est de 5 jours. L'exposition au sédiment a lieu pendant toute la durée du développement embryonnaire. L'évaluation de la mortalité embryonnaire et larvaire est effectuée chaque jour au moyen d'un loupe binoculaire. Le succès à l'éclosion est évalué et l'analyse morphométrique est réalisée sur les larves à l'éclosion à partir de la première éclosion. Un test comportemental est effectué au moyen du système Daniovision (Ethovision X9, Noldus) puis la génotoxicité est évaluée par le test des comètes.

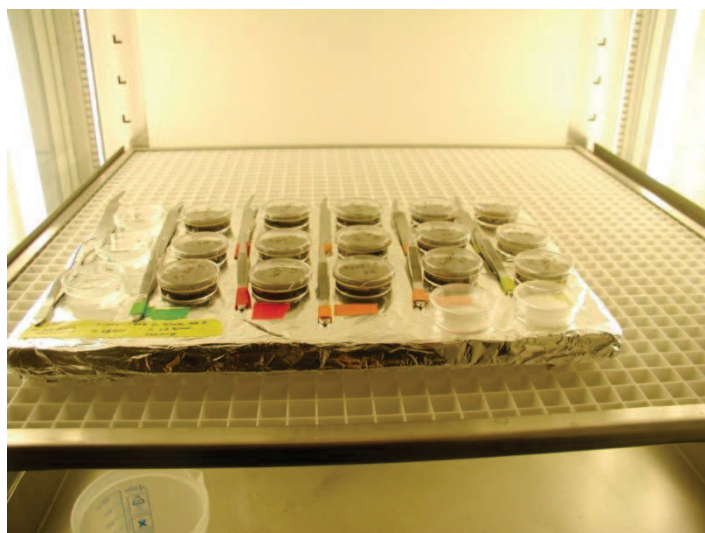


Figure 16 : Exposition des embryons de médaka japonais lors du test MELAc.

E. Tester la viabilité des esturgeons et la variabilité des conditions dans le milieu

Afin d'évaluer la qualité des frayères il est important de prendre en considération, non seulement la qualité du sédiment mais aussi celle de l'eau, de ses caractéristiques physico-chimiques et de la variabilité de ces dernières. Ainsi, une incubation directe d'embryons d'esturgeon européen en milieu naturel a été réalisée (juin 2014). Pour cela, quatre sites ont été équipés de dispositifs d'encagement (Figure 17, page 57). Pour deux de ces sites, un suivi des conditions physico-chimiques a été réalisé sur l'ensemble de la période de reproduction de l'espèce (La Réole en Garonne et Pessac-sur-Dordogne en Dordogne). Sur chaque dispositif des capteurs passifs de contamination de l'eau (POCIS), des prélèvements d'eau, de sédiment et de biofilm ont été réalisés. Les incubateurs contenant les embryons ont été relevés environ 10 jours après leur dépôt et leur contenu a été analysé.

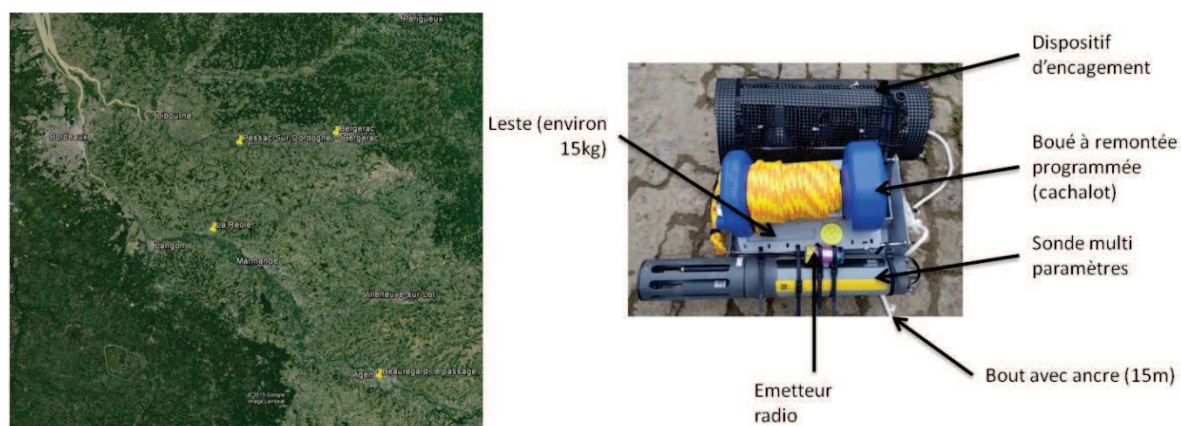


Figure 17 : Localisation des sites de dépôts d'incubateurs (gauche) et dispositif de mesures et d'encagement utilisé (droite).

III. Evaluer la tolérance de l'esturgeon vis-à-vis des polluants

A. Etat de contamination d'un site connu

Afin de tester l'impact des polluants sur le développement embryo-larvaire dans des conditions réalistes, la contamination d'un site en particulier a été reproduite en laboratoire. Le site de La Réole est connu pour être contaminé par de multiples composés comme le cadmium, l'arsenic ou l'argent (Audry et al., 2004a; Blanc et al., 2006; Lanceleur et al., 2011; Deycard et al., 2014) ainsi que des composés organiques (Freour et al., 1960; Barjhoux, 2011). Ce site, dans le cadre de la directive cadre sur l'eau (DCE), fait l'objet d'un suivi annuel pour certains des polluants. Plusieurs analyses ont montré les différentes contamination de ce site (Table 1, page 39 et Table 2, page 40). La contamination du site de La Réole se fait sentir dans la phase sédimentaire, dans les matières en suspension mais aussi en phase dissoute dans l'eau.

B. Etablir les conditions d'exposition réalistes

La réalisation d'une gamme de contamination a été faite en se basant sur les données issues du site de La Réole. Une double contamination par le sédiment (polluants organiques hydrophobes) et l'eau (polluants organiques hydrophiles et métaux) a été réalisée. Trois niveaux de contaminations (0,3X ; 1X ; 3X) ont été établis en prenant en compte les concentrations des principaux polluants retrouvés sur le site. Le dichlorométhane a été utilisé comme solvant pour les polluants organiques. La toxicité de ce composé pour l'esturgeon européen a été évaluée par ajout de dichlorométhane à du sédiment contrôle à la même concentration que dans les essais. Ces concentrations sont nominales, les concentrations réelles sont actuellement en cours d'analyse. Puisque la température influence le comportement de certains polluants, le test a été mené à 20 °C et 23 °C.

C. Adaptation du protocole

Le renouvellement de l'eau est essentiel pour l'élevage de l'esturgeon européen. Ainsi, la contamination de la colonne d'eau a été réalisée en continu au moyen d'une pompe péristaltique perfusant une solution de contaminant de manière à rester dans les concentrations voulues pendant toute la durée de l'exposition (Figure 11, page 51).

IV. Conclusion

Les trois conditions environnementales en question dans cette étude ont été étudiées séparément et en combinaison. De ces différents travaux, cinq publications ont été réalisées ou sont en cours de réalisation (Figure 18, page 59). Chacune de ces publications apporte un éclairage différent sur la question initiale posée qui est de connaître les effets des conditions environnementales. Ainsi, les chapitres 2 et 3 sont focalisés sur l'impact de la température et de la concentration en oxygène dissous sur les jeunes stades d'esturgeon européen. Le chapitre 2 permet de connaître la sensibilité des embryons et des larves à ces facteurs environnementaux. Le chapitre 3 ajoute à cette dernière évaluation l'évolution de la sensibilité avec le stade de développement. Les chapitres 4 et 5 ont pour but d'évaluer la qualité des sédiments de frayères. La méthode MELAc, utilisée à large échelle dans le chapitre 5, est validée pour la comparaison des deux espèces (médaka japonais et esturgeon européen) dans le chapitre 4. Enfin, le chapitre 6 permet l'évaluation de la sensibilité des embryons et des larves d'esturgeon européen aux polluants.

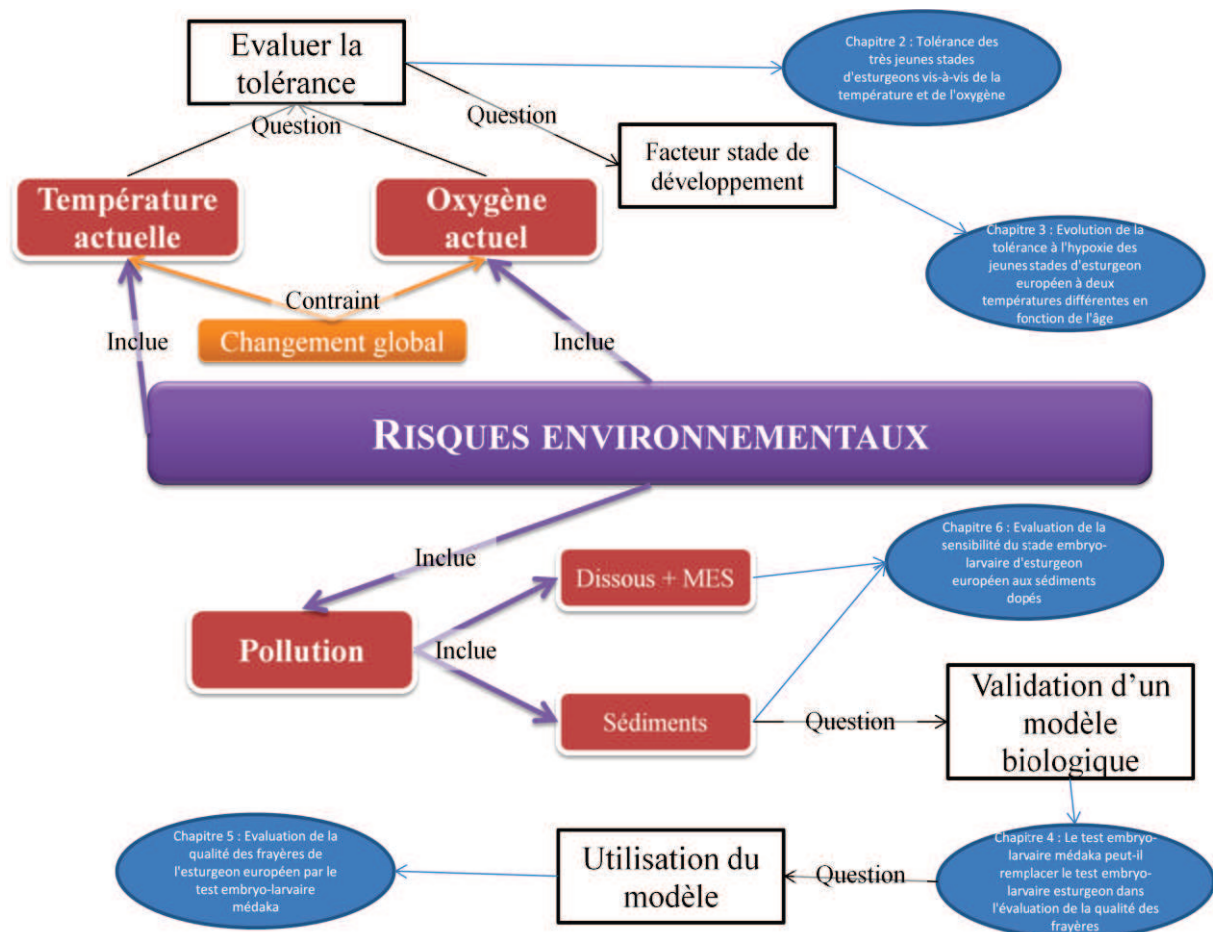


Figure 18 : Schéma global de la méthodologie utilisée lors de ce travail et des publications réalisées ou envisagées par rapport aux résultats de ce travail.

CHAPITRE 2 : TOLERANCE DES TRES JEUNES
STADES D'ESTURGEONS VIS-A-VIS DE LA
TEMPERATURE ET DE L'OXYGENE

I. Préambule

La température et la disponibilité en oxygène sont deux facteurs environnementaux gouvernant les processus biologiques. La disponibilité en oxygène du milieu est particulièrement importante dans les milieux aquatiques où l'hypoxie est devenue un problème récurrent dans certaines zones (Diaz and Rosenberg, 2008). Selon Diaz et Rosenberg (1995), les premières espèces sensibles à une diminution de la disponibilité en oxygène sont les espèces benthiques. La quantité d'oxygène dissous d'un milieu aquatique est dépendante, entre autres, de la température. En effet, l'augmentation de la température implique une diminution de la solubilité de l'oxygène dans l'eau. Dans le contexte des changements globaux (IPCC, 2007; IPCC, 2013), une augmentation des températures des eaux de surface ainsi qu'une diminution de la quantité d'oxygène disponible a été constatée. Ces impacts globaux ont également été constatés localement sur le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne (GGD) (Ferradou Fine, 2013).

Les jeunes stades d'esturgeon européen relâchés aux cours de ces dernières années sont supposés revenir se reproduire prochainement dans le bassin de GGD. En prévision de ces prochaines reproductions, une connaissance de la tolérance des jeunes stades vis-à-vis de ces deux facteurs environnementaux est nécessaire. La détermination de leurs seuils de tolérances permet d'avoir une idée de la capacité de survie et de développement de l'espèce dans le milieu considéré.

La dernière reproduction naturelle connue d'esturgeon européen a eu lieu en 1994 dans le bassin de GGD (Lepage and Rochard, 1995). Depuis cette époque, le changement climatique et la modification des activités humaines dans le bassin peut avoir conduit à des conditions impropres au développement de l'espèce. L'objectif de cette publication est d'évaluer si les conditions oxythermiques actuelles ou futures permettent la survie et le développement des jeunes stades en testant des conditions actuelles et des projections réalistes sur la base des scénarii émis par le GIEC (2007).

Une gamme de six températures de 12 à 30°C et une gamme de quatre niveaux de saturation en oxygène de 90 à 30 % O₂ sat a été testées. Les jeunes esturgeons européens ont été exposés aux conditions expérimentales depuis la fécondation jusqu'à la résorption de la vésicule vitelline. L'impact de ces deux facteurs a été évalué indépendamment et de façon croisée sur plusieurs critères d'effets létaux et sublétaux.

Article n°1 : Oxythermal window drastically constraints the survival and development of European sturgeon early life stages⁴

Delage N.^[1,2], Couturier B.^[1], Jatteau P.^[1], Larcher T.^[3,4], Ledevin M.^[3,4], Goubin H.^[3,4], Cachot J.^[2], Rochard E.^[1]

¹ IRSTEA EABX, Aquatic Ecosystems and Global Changes research unit, 50 avenue de Verdun 33612 Cestas France

² University of Bordeaux, UMR CNRS EPOC 5805, Allée Geoffroy Saint-Hilaire - CS 50023 - 33615 Pessac Cedex, France

³ INRA, UMR 703 APEX, Oniris La Chantrerie, Nantes

⁴ LUNAM Université, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-atlantique (Oniris), Nantes

ABSTRACT

European sturgeon (*Acipenser sturio*) is an anadromous fish which has been in sharp decline. Its last natural reproduction occurred in 1994. Because of global change, temperature have risen, frequency and severity of hypoxic events have increased. The goal of this paper is to determine the sensitivity of *A. sturio* early life stages to temperature and oxygen saturation and possible implications for *A. sturio* reproduction in the Gironde-Garonne-Dordogne catchment. Embryo-larvae were exposed to combined temperature conditions, ranged from 12°C to 30°C, and dissolved oxygen, ranged from 30 to 90 % O₂ saturation (% O₂ sat). Lethal and sublethal effects were evaluated using embryonic and larval mortality, hatching success, malformation rate, yolk sac resorption, tissue development, routine metabolic rate (RMR) and swimming speed. Embryonic survival peaked at 20°C and no survival was recorded at 30°C. No hatching occurred at 50 % O₂ sat or below. Malformation appeared to be minimum at 20°C and 90 % O₂ sat. Maximum RMR for ELS development were recorded at 20°C under 90 % O₂ sat and at 16°C under 70 % O₂ sat. At 20°C, RMR was lower at 70% O₂ sat than at 90% O₂ sat. Swimming speed peaked at 16°C. *A. sturio*'s temperature optimum was shown to be close to 20°C. Its upper

⁴ Soumis le 24 mars 2015 à Journal of Fish Biology

tolerance limit is between 26 and 30°C and its lower tolerance limit is below 12°C. Oxygen depletion induce sublethal effects at 70 % O₂ sat and lethal effects at 50 % O₂ sat. Current conditions in the basin are sustainable for *A. sturio* but observing its sensitivity to oxygen depletion, a slight decrease of current O₂ levels would have large impact on European sturgeon survival capacity in the basin.

INTRODUCTION

European sturgeon (*Acipenser sturio*) is the largest fish species in western Europe. However, since the beginning of the 20th century populations have been in sharp decline due to a combination of anthropogenic pressures, notably overfishing and habitat destruction (Williot and Castelnaud, 2011). Another possible contributory factor is pollution, however this has yet to be confirmed by any data.

Nowadays, the only remaining population of European sturgeon lives and reproduces in the Gironde-Garonne-Dordogne (GGD) catchment in southwest France (Lassalle et al., 2010b; Williot and Castelnaud, 2011). The species is strictly protected and listed in many conventions and European directives (Bern, OSPAR, etc.) (Rochard, 2011). The last instance of natural reproduction in the GGD catchment was observed in 1994 (Rochard et al., 2001). A captive brood stock was established at the Saint Seurin-sur-l'Isle research station from adults and juveniles captured in the wild. Since 1995, over 1.6 million juveniles and larvae have been produced at Saint Seurin sur l'Isle and subsequently released into the Garonne and Dordogne rivers to support the population. Depending on their life stage, populations of European sturgeon are spread across the Gironde Estuary, the bay of Biscay, and the North Sea (Rochard et al., 1997; Lepage and Rochard, 2011). It is generally expected that upon reaching maturity, they will return to the GGD catchment to breed and spawn (Acolas et al., 2011). Environmental conditions (surface water temperature, water flux, hypoxic events, etc.) as well as human activities (toxic compounds released) have changed drastically between 1994 and the present day, a trend that is expected to continue in the coming years (Rabalais et al., 2010; IPCC, 2013).

It is well documented that increases in temperature can induce ontogenesis impairment in fish (Johnston et al., 2009; Kieffer et al., 2011) leading to developmental defects (Lo et al., 2011). It can also impair physiological performances (Gisbert et al., 2002; Hassell et al., 2008a), behaviour (Dalla Via et al., 1998) and even survival (Hassell et al., 2008a; Kappenman et al., 2013). Hypoxia can also affect fish survival and fitness at several developmental stages, while also influencing biological organisation. These adverse effects may include developmental

abnormalities and reduced hatching success (Hassell et al., 2008b; Lo et al., 2011), changes in space utilisation (Abe and Sakamoto, 2011), reduced anti-predator behaviour efficiency (Lefrançois and Domenici, 2006; Domenici et al., 2007), and induction of DNA damage (Mustafa et al., 2011).

European sturgeons, specifically those at young stages, whose development takes place in fresh water, experience such fluctuations in temperature and dissolved oxygen during time spent in the GGD catchment. A preliminary study has shown that for European sturgeon, the embryo-larval stage is more sensitive to high temperatures than older stages (Delage et al., 2014). We observed a drastic decrease in hatching rate for embryos reared at 26°C compared to individuals exposed to 20°C. No effects were observed in juveniles exposed to 20°C and 25°C in limited oxygen conditions. There is still a lack of knowledge about the combined effects of high temperatures and low levels of dissolved oxygen in the context of global warming. From an ecological standpoint, determining upper and lower temperature thresholds is a useful tool in identifying the distribution of a given species (Pörtner, 2001).

Metabolism evaluation and bioenergetic analysis provide a unique insight into individual status under physiological stress (Fry, 1971). At the embryo-larval stage, respirometric analyses give an opportunity to simultaneously evaluate the cost of development and organogenesis (Gisbert et al., 2002; Mueller et al., 2011a).

Swimming behaviour is partially related to temperature and oxygen levels. For example: maximum speed, acceleration and behavioural consistency increase under optimal environmental conditions (Claireaux and Lefrançois, 2007). On the other hand, biotic or abiotic stress can impair the relationship between physiological traits and associated behaviour (Killen et al., 2013).

The goal of this study was to assess the sensitivity of European sturgeon to temperature and dissolved oxygen conditions through a combination of biological (survival, developmental abnormalities) metabolic (oxygen consumption) and behavioural (swimming speed) indicators. Using these indicators, it was possible to determine the optimal temperature and oxygen ranges for development. According to Pörtner (2001), when assessing the environmental sustainability of an organism, it is essential to define thresholds such as the range of maximum capacity (called critical temperatures) and the range of tolerance (called pejus temperatures). In addition, *A. sturio* optimal development conditions were analysed in regard to temperature and daily oxygen saturation in the GGD basin over the last 20 years.

MATERIALS AND METHODS

Embryo collection and exposure

Exposure conditions were designed to replicate the range of temperature and oxygen concentrations found in the GGD. Temperatures between 12°C and 30°C (12°C; 16°C; 20°C; 23°C; 26°C; 30°C). Dissolved oxygen content saturation ranged from 30 to 90% O₂ sat were tested (30; 50; 70 and 90% O₂ sat) (Table 4). Dechlorinated tap water was used during the experiment with a 20% water renewal per day. Water flow was established to renew water in each replicates twice an hour.

Table 4: Oxygen and temperature conditions tested. The numbers correspond to the number of replicates performed for each condition tested. For each condition, embryos from two different genetics (except for 20°C and 90 % O₂ sat condition for which four parental origins were used) were used in triplicate to obtain six replicates. At the beginning of the experiment, each replicates were filled with 150 embryos

| Temperature tested (° C) | Oxygen saturation tested (% O ₂ sat) | | | |
|--------------------------|---|----|----|----|
| | 90 | 70 | 50 | 30 |
| 12 | 6 | 6 | - | - |
| 16 | 6 | 6 | - | - |
| 20 | 12 | 6 | 6 | 6 |
| 23 | 6 | 6 | - | - |
| 26 | 6 | - | 6 | 6 |
| 30 | 6 | - | 6 | 6 |

Embryos and larvae were exposed using the purpose-built system for European Sturgeon described in (Delage et al., 2014). In each experiment two genetic origins were used (Table 4). After fertilisation (Delage et al., 2014), the water temperature was gradually modified (1°C per hour) from 18°C to reach the exposure temperature within two to twelve hours. Embryos were exposed to these temperature conditions until yolk sack resorption. Once the exposure temperature was reached, hypoxia exposure gradually started (10% decrease per hour) to reach the targeted O₂ level. Oxygen depletion lasted 48 hours corresponding to the longest continuous period of oxygen depletion. The oxygen level was then increased back to 90% O₂ sat. Temperature and oxygen saturation were checked and recorded every two minutes over the course of the experiment using a parameter control and recorder unit (SOFREL, S550; LACROIX, Vern sur Seiche, France).

Embryo-larval assay

Dead embryos and larvae were counted and removed every day in order to assess mortality. Mortality during the first day of the experiment was not taken into account since it may be due to naturally occurring development arrest, problems when handling oocytes and unfertilized oocytes. Mean embryo viability was evaluated for each condition and each genetic cross. Hatching rate (HR) in each incubator was recorded every two hours from the first hatching event and up to 12 hours after the last one.

Gross malformations were recorded using binocular microscopy (Olympus ZX12). Three types of malformation were distinguished: oedema, skeletal axis malformations and heart malformations.

In addition, a total of thirty-nine larvae at yolk sac resorption stage were fixed in 4 % formalin for at least 24 h for an histopathological evaluation and 39 others for chondrous development assessment.

For histopathological evaluation, samples were dehydrated in graded ethanol solutions and embedded in paraffin. The principles of step sectioning have already been published for zebrafish (Spitsbergen et al., 2000). For the present study, serial sagittal step sections were cut from the left side of the larvae. Four-step sections from each larvae were mounted on glass slides, one from eye anterior chamber level, one from eye posterior chamber level, one just medial to the eye and one at the midline. Sections were routinely stained with haematoxylin-eosin-saffron (HES). All lesions were recorded by a skilled pathologist. The area of the yolk sac was measured on the midline section using a digital camera combined with a dedicated software (Nikon Imaging Software, Nikon, Badhoevedorp, The Netherlands).

Chondrous tissue development was assessed using the alcian blue-alizarin red double staining technique (Darias et al., 2010). Briefly, whole larval carcasses were first immersed in Alcian blue (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) for cartilage staining for 30 min, before neutralization for 3 min with a solution of 1% KOH in ethanol. After rehydration, 1 volume 3% H₂O₂ and 9 volumes 1% KOH were used to bleach larvae for 25 min. After clearing in 30% sodium borate with 1 g trypsin (Sigma) for 20 h, calcification centres were stained with alizarine red (Sigma) for 1 h. The larvae were dehydrated and preserved in 100% glycerol. Gross abnormalities were recorded and individual chondral development was evaluated using a cumulative score reflecting alcian blue positive-tissues in jaw, skull, vertebral axis, pectoral and dorsal fins.

Semi-quantitative evaluation of posthatching tissue development was performed for skin, gill, liver and yolk sac development. For skin, individual score was determined upon chromophorous cell presentation as following: 0= cellular body; 1=cytoplasmic processes;

2=epidermal pigmentation. For gill, individual score was determined as following: 0=no lamellae; 1=sprouting; 2=mature lamellae. For liver, individual score was determined upon sinusoid capillary presentation as following: 0=blood capillary dilatation (also known as peliosis); 1=mature vascularisation. For yolk sac, individual score was determined upon epithelium presentation as following: 0=pavimentous epithelium; 1=cubic epithelium; 2=cubic to columnar epithelium with pithelial folds. An individual composite index of tissular development expressed in percentage was then calculated as the ratio between the sum of skin, gill, liver and yolk sac scores and the maximal total score.

Larval swimming behaviour was evaluated using Ethovision®9 software (Noldus). Individual larvae were placed in Petri dishes of 10 cm diameter filled with rearing water on an infrared light floor. An infrared camera was placed above the equipment. Ten individuals per condition were tested simultaneously. The room light was switched off one hour before the beginning of the test to allow larvae to acclimatise. Video recording lasted 20 minutes in darkness and mean velocity was measured every 30 seconds.

Aerobic metabolism was measured using routine metabolism rate (RMR). The respirometric chamber of 13 mL containing system is composed with an enclosed chamber filled with 10 larvae. The respirometric chamber can be filled with water through two valves using a peristaltic pump.

When the first valve is closed, no new oxygen reaches the fish, making it possible to measure the decrease in dissolved oxygen concentration corresponding to that consumed by the test organism. This is referred to as the "closed circuit" condition. When the second valve is closed, water can be refreshed, thus introducing more oxygen into the system to balance the drop in oxygen during the closed period. This is referred to as the "open circuit" condition. Eight respirometric chambers operated simultaneously throughout the experiment. Individuals were acclimatised during one-hour dark periods at rearing temperature before their oxygen consumption was measured (Gisbert et al., 2002; Mueller et al., 2011a). Oxygen consumption was recorded during five periods of five minutes during which respirometers worked in the closed circuit condition (Mueller et al., 2011a). Between each stage of recording, the open circuit condition was activated to renew water in the respirometer chambers. At the end of the test, fish were removed and a last recording was performed to evaluate micro-organism oxygen consumption in each chamber. Each individual fish was weighed and measured at the end of the experiment. Oxygen saturation level never dropped under 80% in respirometers.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the R software⁵ (R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Replicated conditions were considered as independent experiments. Data normality was checked using the Shapiro-Wilk test and equality of variance was verified using the Bartlett test. In the case of a normal distribution of data and equality of variance, a two-way analysis of variance was performed (ANOVA) followed by a Tukey post hoc test. When one of these criteria was not fulfilled, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed, followed by a Wilcoxon test for the embryo-larval experiment. No data transformation was used.

RESULTS

Acute effects

An Anova test showed statistical differences between temperature conditions ($p\text{-value} = 1.44 \times 10^{-5}$) and between oxygen conditions ($p\text{-value} = 1.14 \times 10^{-8}$) allowing to establish two groups, one exposed to either 50 and 30 % O₂ sat with no survival and the other one exposed to 70 and 90 % O₂ sat with high survival (Figure 19, page 70). In all oxygen conditions, minimum mortality rate was observed at 20°C. Embryonic mortality rates increased until 80% and almost 100% at 12 and 30°C respectively. The combination of temperature and hypoxia had pronounced effects on embryonic survival.

⁵ R Development Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>.

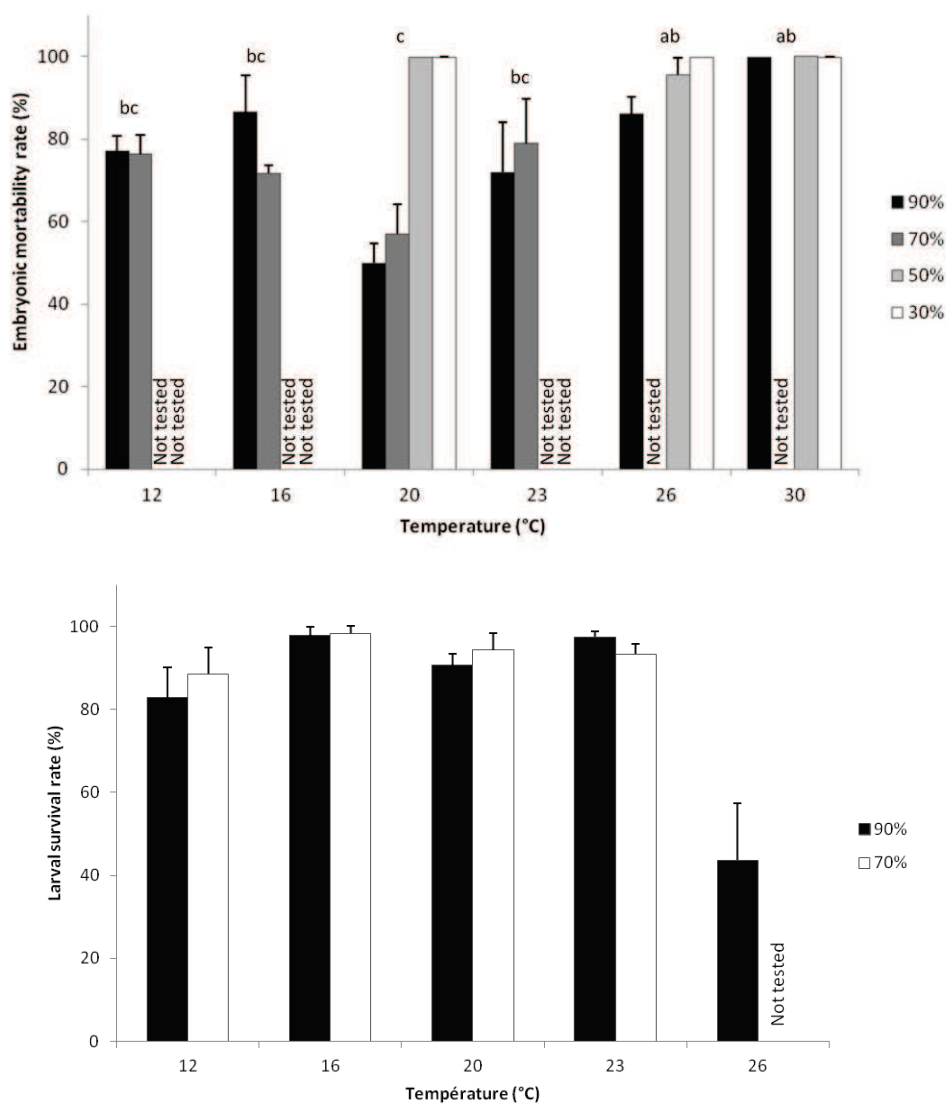


Figure 19: Embryonic mortality (top) and larval survival (bottom) of European sturgeon based on temperature exposure throughout their development (mean \pm SE) and 30, 50, 70 or 90% O₂ sat for the first 48h of incubation. No data were collected for 50 and 30% O₂ sat at 12, 16 and 23°C and for 70% O₂ sat at 26 and 30°C. Statistical differences between temperature conditions are indicated by different letters (N= 102).

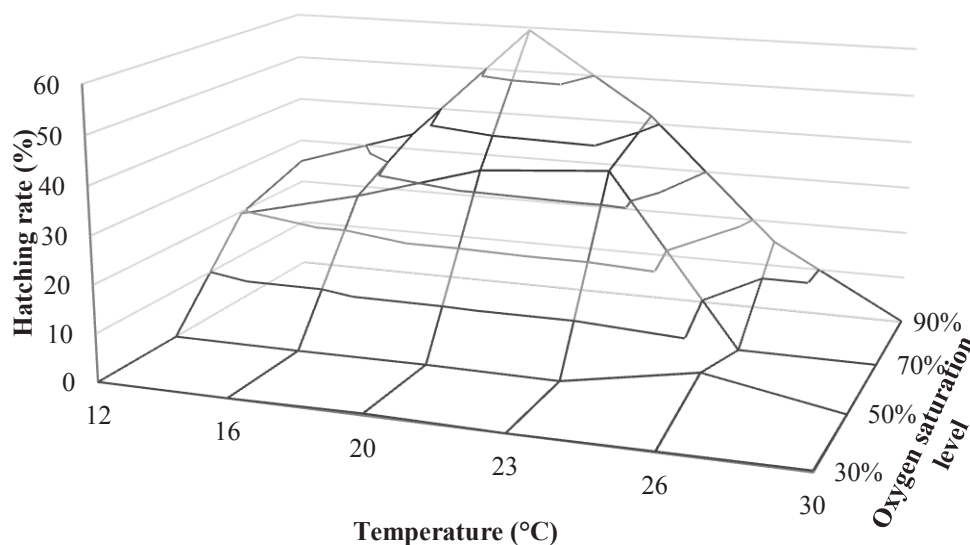


Figure 20: Hatching rate (%) of European sturgeon embryos according to temperature and oxygen saturation (N= 102). No data were collected for 50 and 30% O₂ sat at 12, 16 and 23°C and for 70% O₂ sat at 26 and 30°C.

The general shape of this oxythermal relationship is unimodal. In terms of temperature, the hatching rate (Figure 20, page 71) was at its highest at 20°C, while in terms of dissolved oxygen content, the hatching rate peaked at 90%. The best combination (20°C, 90% sat) leads to a hatching rate of $60\% \pm 0.18$ (mean \pm SE). Comparing to hatching rate obtained in hatchery, the results obtained in this study are low, supposedly due to the lack of clay treatment. No hatching occurred at 30°C and 50% O₂ sat and below (except 17 individuals hatched at 26°C and 50% O₂ sat in a single replicate). Anova showed statistical differences in hatching rates between different temperature conditions (p-value = 6.84×10^{-7}) and oxygen conditions tested (p-value = 6.57×10^{-10}). No significant difference was observed between 90 and 70 % O₂ sat within each temperature condition tested (p-value > 0.05). For all oxygen conditions, the hatching rate was higher at 16, 20 and 23°C as opposed to 26 and 30°C. The hatching rate at 12°C was not statistically different from the all other temperature conditions.

Sub-acute effects

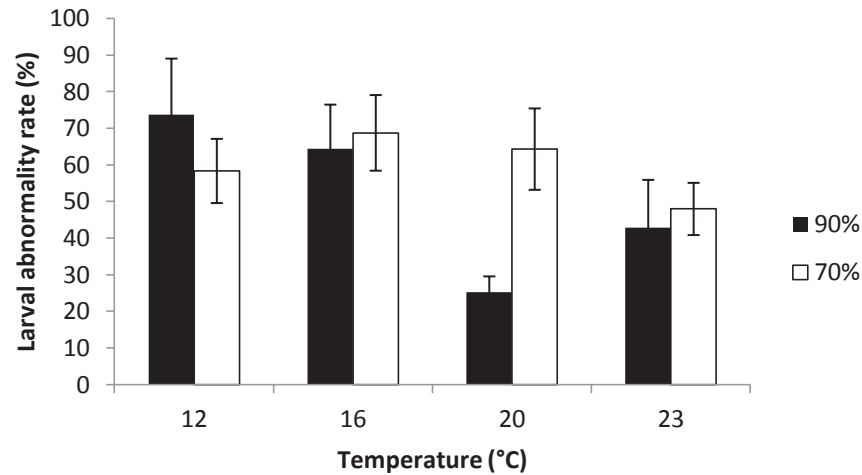


Figure 21: Malformation rate (Mean \pm SE) in European sturgeon larvae (2 dph) according to temperature exposure throughout their development and 30, 50, 70 or 90% O₂ sat for the first 48h of incubation. Because of low survival at this stage, malformation rate could not be evaluated for conditions over 23°C and below 70 % O₂ sat. No statistical differences were observed between conditions (N=6 except for 20°-90% N=12)

A Kruskal-Wallis test performed on malformation rate (Figure 21, page 72) data showed no significant differences between conditions resulting from high variability (p-value = 0.063). Malformation rates showed that the minimum deformities were observed at 20°C in normoxia with level of 25.2 \pm 4.3. At lower and higher temperatures, a trend towards an increase in frequency and individual score of deformed larvae (data not shown) was observed. In hypoxic conditions, no difference in malformation rates appeared between temperature conditions.

Larval development was first assessed by measuring yolk sac maximal area on mid-level sections (Figure 22, page 73). An Anova test showed statistical differences between temperature conditions (p-value < 0.0001). The largest yolk sacs were observed at 12°C demonstrating an involution delay at this temperature and yolk sacs were smaller at 16 and 23°C. No significant difference was observed between 90 and 70% O₂ sat within each temperature condition tested.

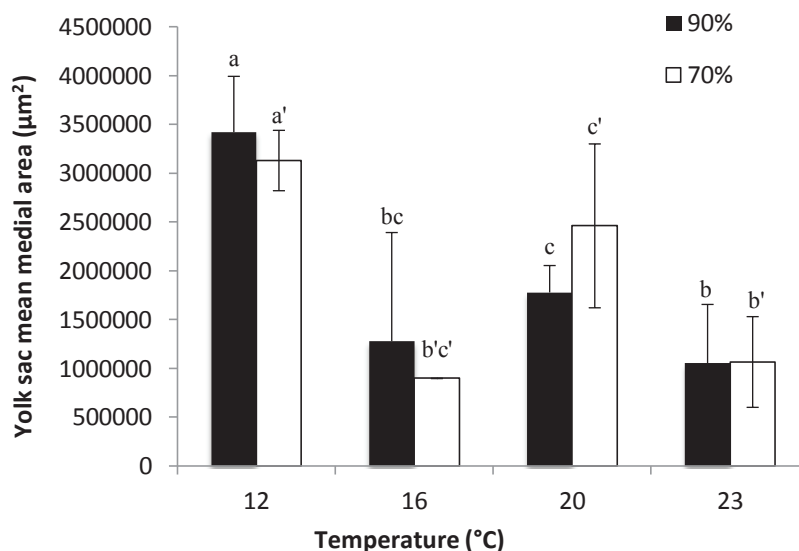


Figure 22. Yolk sac area (mean \pm SE) in 2 dph European sturgeon larvae according to temperature exposure throughout their development and 70 or 90% O₂ sat for the first 48h of incubation. Statistical differences between temperature conditions are indicated by different letters (N= 31)

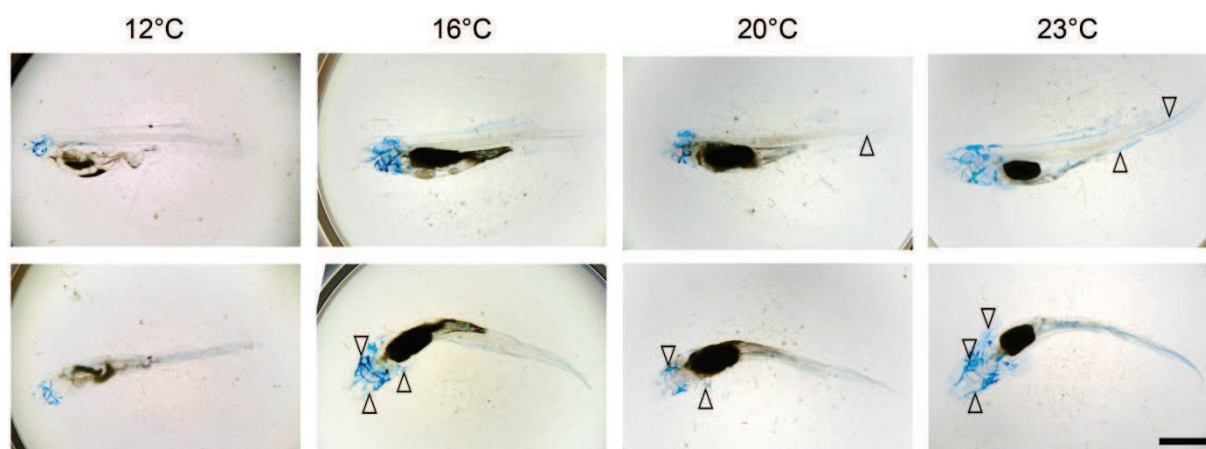


Figure 23. Chondral tissue deposition in 2 dph European sturgeon larvae according to temperature exposure throughout their development. Upper panel: Left lateral view; Lower panel: dorsal view. In blue, anatomical sites of chondrous tissue deposition, as visualized by alcian blue staining, were recorded. Arrowheads indicate chondral tissue in the vertebral axis and anal fin (upper panel) and in eye-orbit, dorsal skull and pectoral fins (lower panel). Alcian blue and alizarin red staining on bleached larvae. Same magnification for all pictures, bar =2 mm.

Chondrous tissue was observed in bleached larvae following alcian blue staining. No calcification was detected after alizarin red staining on the same samples (Figure 23, page 73). The sequence of chondrous deposition was as following: jaw, eye-orbit, skull, vertebral axis, pectoral and dorsal/anal fins. Only 2 larvae (from 20°C-70% O₂ sat and 16°C-90% O₂ sat conditions) out of 39

(5.1%) displayed an altered sequence with a delay in skull chondrous deposition. At 12°C, chondrous tissue was only and irregularly detected in jaws, skull and eye-orbits. With higher temperatures, chondrous tissue was more developed and total number of chondral tissue deposition sites was highest at 23°C (Figure 24, page 74).

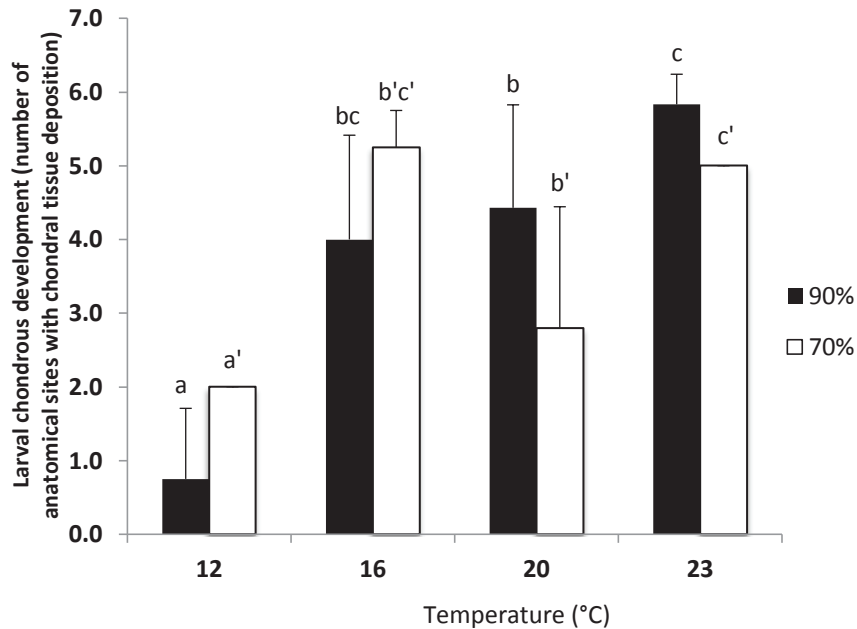


Figure 24: Number of anatomical sites that displayed chondral tissue deposition (mean ± SE) in 2 dph European sturgeon larvae according to temperature exposure throughout their development and 70 or 90% O₂ sat for the first 48h of incubation. Statistical differences between temperature conditions as assessed by Kruskal-Wallis test are indicated by different letters (N= 39)

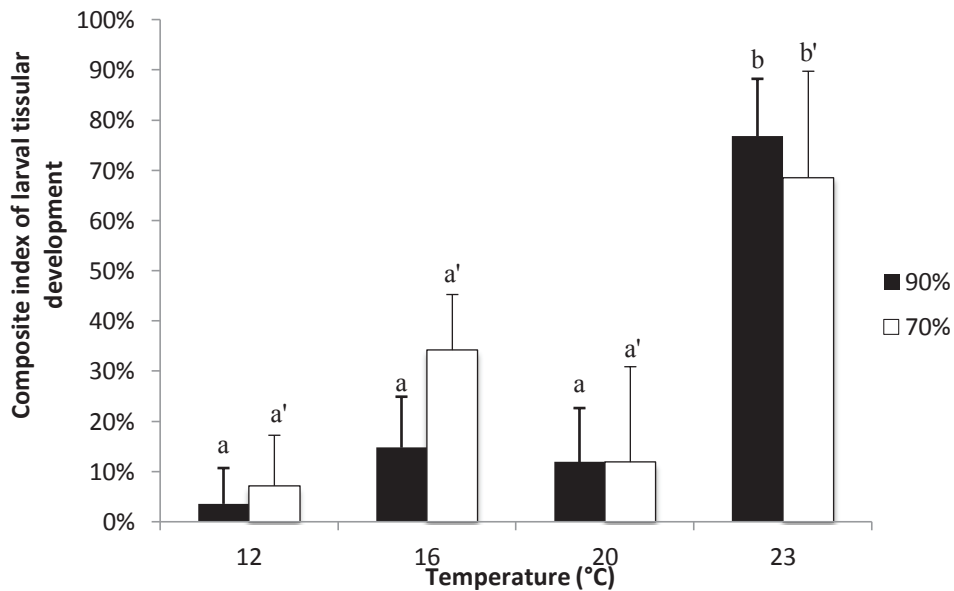


Figure 25: Composite index of tissular development (mean ± SE) in 2 dph European sturgeon larvae according to temperature exposure throughout their development and 70 or 90% O₂ sat for the first 48h of incubation. Statistical differences between temperature conditions are indicated by different letters (N= 39)

Serial sections of whole larvae were microscopically observed after topographic HES staining. No histological lesion was reported. Some differences in tissular development degrees were observed and scored to calculate a composite index (Figure 25, page 74). An Anova test showed statistical differences between temperature conditions ($p\text{-value} < 0.0001$). Tissular development was maximal at 23°C. At lower temperatures, cutaneous pigmentation, gill lamellae, hepatic vascularisation and yolk sac epithelium displayed some immature features. No significant difference was observed between 90 and 70% O₂ sat within each temperature condition tested.

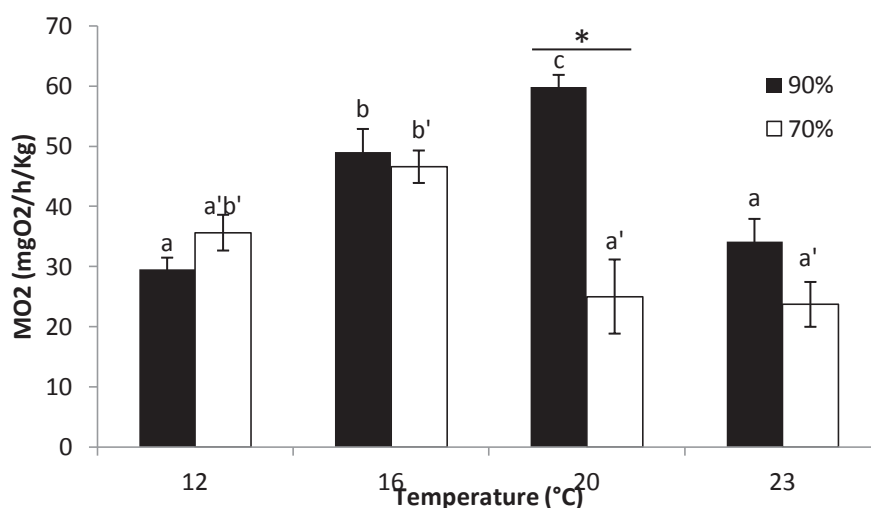


Figure 26: Evaluation of the routine metabolic rate in 2 dph larvae according to temperature exposure throughout their development (mean \pm SE) and 90 and 70 %O₂ sat for the first 48h of incubation. Because of low survival at this stage, routine metabolic rate could not be evaluated for conditions over 23°C and conditions below 70 % O₂ sat. Statistical differences between temperature conditions are indicated by different letters. Stars show differences within a single temperature condition (N= 271)

Routine metabolism (RMR) was used to estimate the aerobic metabolic scope of sturgeon larvae (Figure 26, page 75). An Anova test showed statistical differences between oxygen consumption (MO₂) according to temperature ($p\text{-value} = 3.11 \times 10^{-10}$) and oxygen conditions tested ($p\text{-value} = 1.62 \times 10^{-7}$). Maximum RMR were recorded at 20°C in normoxia and 16°C in hypoxia. At 12°C, 16°C and 23°C no significant difference appeared between normoxia and hypoxia exposure conditions. At 20°C, MO₂ at 70% O₂ sat was significantly lower than MO₂ at 90% O₂ sat condition ($p\text{-value} < 0.001$).

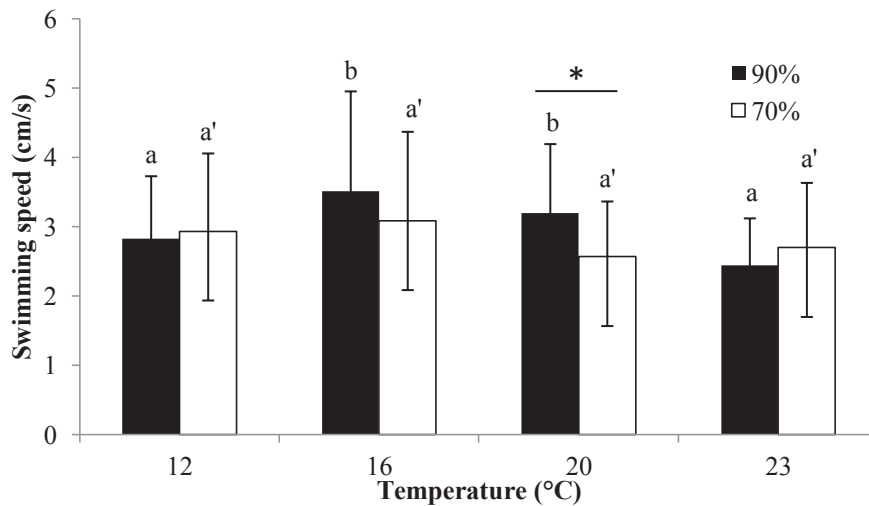


Figure 27: Two dph European sturgeon larvae swimming speed according to temperature exposure throughout their development (mean \pm SE) and 90 and 70 % O₂ sat for the first 48h of incubation. Because of low survival at this stage, behaviour could not be evaluated for conditions over 23°C and conditions below 70 % O₂ sat. Statistical differences between temperature conditions are indicated by different letters, stars show differences within a single temperature condition (N= 149)

Swimming speed of larvae was used here as a proxy of swimming activity (Figure 27, page 76). Similar patterns were observed in both hypoxia (70 % O₂ sat) and normoxia (90 % O₂ sat) conditions. A Kruskal Wallis test showed significant differences between conditions in 90% O₂ sat ($p\text{-value} = 7.807 \times 10^{-5}$) but not for 70% O₂ sat conditions. A swimming speed peak was observed at 16°C for both oxygen conditions. No significant difference appeared when comparing oxygen conditions for a single temperature except at 20°C where swimming speed was significantly lower in hypoxia than in normoxia conditions (Wilcoxon test, $p\text{-value} < 0.001$).

DISCUSSION

The volume of existing data relating to the sensitivity of sturgeon early life stages to temperature and hypoxia is limited. Results shown in this study are clear and consistent with one another, and reinforced by the use of multiple genetic origins.

Effects of temperature

Our results showed that the optimal temperature window of *A. sturio* embryos and larvae was around 20°C, which is consistent with previous works on those stages based on empirical knowledge (Williot et al., 2011b). The maximum survival, hatching success, and metabolism

capacities were observed at 20°C. The minimum malformation frequency also occurred at this temperature. Only swimming speed showed an optimal value at 16°C while tissue development and yolk sac resorption were maximal at 23°C. A drastic deterioration in biological capacities was observed outside the optimal temperature window, confirming that *A. sturio* embryo and pro-larvae are a very sensitive stages as for other fish species (Nicholson et al., 2008; Elshout et al., 2013; Delage et al., 2014).

A drastic decrease in embryonic and larval survival was observed when temperatures reached 26°C, indicating that the upper tolerance limit could be close to this temperature. The same conclusion can be drawn from hatching data. At 30°C, extensive negative effects were recorded with minimal embryonic survival and no hatching at all. It can therefore be asserted that 30°C is over the critical threshold for this developmental stage. Detlaf et al. (1981) provided experimental evidence demonstrating that upper tolerance for embryos in most Eurasian sturgeon species (not including *A. sturio*), except Sevruga, was 20°C. According to Wang et al. (1985) North American sturgeon species spawn between 10°C and 18°C. According to thresholds described in Pörtner (2001), the lower pejus temperature (T_{pl}) for *A. sturio* embryo-larvae stages can be estimated between 16 and 20°C. On the basis of behavioural test results, it can be concluded that this temperature threshold was closer to 16 than to 20°C. The upper pejus temperature (T_{pII}) was estimated between 20 and 23°C. The high critical temperature (T_{cII}) can be estimated at between 26 and 30°C. Because of the range of temperatures tested, the low critical temperature (T_{cl}) was not reached. As far as it can be concluded in this study, the T_{cl} can be estimated at below 12°C. These results would appear to demonstrate that European sturgeon is more tolerant than other Eurasian sturgeon species to high temperatures.

The sensitivity estimated in this study focus on the embryo-larval stage generally speaking. Differences in sensitivity may occurred focus on the different stages of this development. For instance it is well known that sensitivity to temperature (Johnson et al., 1989) and pollutant (Shazili and Pascoe, 1986) change before and after the eyed stage in fish.

Effects of hypoxia

It is widely acknowledged that hypoxia negatively impacts survival and development in fish species according to their tolerance, life stage, and physiological traits (Wu, 2002; Shang and Wu, 2004; Lo et al., 2011; Richards, 2011). In the present study, the effects of hypoxia on

embryos and larvae were clearly expressed by a clear decrease in most of the criteria recorded after only 48h exposure to depleted oxygen condition. It is noteworthy that after exposition for 48h below 50% O₂ sat, no hatching was observed whatever the temperature. Similar observations were reported in *Acanthopagrus butcheri* exposed during embryonic stage to 30% O₂ sat (Hassell et al., 2008a). This could be explained by the fact that oxygen demand during the embryonic stage is low (Gisbert et al., 2002) and fish were able to withstand to hypoxia up to 70 % O₂ sat to ensure survival and routine metabolism. Low oxygen concentration impairs normal development, ultimately leading to mortality (Rombough, 1988b) and reduced hatching success (Hassell et al., 2008a). In this study the same experimentation was carried but with hypoxia limited to the first 48h of development. The results indicate that hypoxia has a delayed effect on hatching success. Individuals were exposed to hypoxia at embryonic stage - the point at which development of all structures such as the vascular and respiratory systems takes place (Burggren and Pinder, 1991). Hypoxia is known to impair fish young stages development (Shang and Wu, 2004). Interestingly, moderate hypoxia (70% O₂ sat) had no effect on tissular development and yolk sac resorption of sturgeon larvae.

Combined effects of temperature and hypoxia

Results obtained in this study point to the conclusion that the effects of oxygen depletion on European sturgeon embryo development and survival are more pronounced than those caused by variations in temperature except for tissue development and yolk sac resorption. Hypoxia would also appear to have an impact on the individual response to temperature. According to Fry (1971), water temperature and dissolved oxygen availability are factors which limit the active metabolism, thus reducing routine metabolism when moving away from optimum conditions. The effects of hypoxia on aerobic metabolism at embryonic stage could explain the fact that the optimal temperature changes from 20°C in normoxia to 16°C in hypoxia. This variation could at least in part be attributed to the fact that 70 % O₂ sat at 20°C represents a lower oxygen concentration than the same oxygen saturation at 16°C. Because of the increase in oxygen availability, embryos exposed to 16°C or 12°C and 70% O₂ sat may not therefore have been suffering from a lack of oxygen. In zebrafish (*Danio rerio*) exposed to hypoxia until 96 hours post fecundation (hpf), a long term adaptation to metabolic stress induced a decrease in heart rate (Shang and Wu, 2004).

In individuals exposed to hypoxia at early life stages, the effects of temperature are not obvious. Hypoxia is known to induce malformations and delays in development in zebrafish

(Shang and Wu, 2004). At 24 and 48 hpf, hypoxia was shown to stimulate the expression of the Insulin-like growth factor binding protein 1 in zebrafish, resulting in the inhibition of Insulin-like growth factor signalling related to primordial germ cell migration (Lo et al., 2011). Occurrence of hypoxic events during early life stages induced deleterious effects on developing sturgeons, and thus representing an important element in terms of conservation. The threshold of hypoxic effects can be estimated to be around 70 % O₂ sat for European sturgeon embryos.

At the larval stage, it was observed that the swimming speed in individuals exposed to hypoxia at early life stages was always equal to or less than the values observed in normoxia. Individual swimming capacity seems to be altered by hypoxia even when oxygen conditions return to normoxia.

The optimal temperature for routine metabolism in individuals exposed to hypoxia at early life stages would appear to be 20°C in normoxia as opposed to 16°C in hypoxia. At 16°C, the metabolism of ectotherms decreases. Significant differences between the metabolic rate of individuals exposed to hypoxia and normoxia were observed only at 20°C (from 25 mg O₂/kg/h in hypoxic condition to 60 mgO₂/kg/h in normoxic condition). At this temperature, the metabolism of individuals exposed to hypoxia was markedly lower than in normoxia suggesting the existence of an oxygen concentration threshold.

Implications for *A. sturio* embryonic development in the GGD basin

As with most fish species, *A. sturio*'s reproduction period depends on temperature. In the north, breeding occurs later than in the south (Magnin, 1962). Observations performed in GGD basin show a mean surface water temperature close to 20°C (min = 11.5°C ; max = 27.2°C) and a mean oxygen saturation close to 90 % O₂ sat (min = 44.5 % O₂ sat ; max = 111.4 % O₂ sat) during the natural breeding period (May-June) of this species (MAGEST, 2011). According to the different thresholds described in this study, the number of days where the daily mean (in terms of temperature and oxygen) reached tolerance and critical limits during the European sturgeon breeding period was recorded (Figure 28, page 80). On the basis of these results, sublethal effects could have occurred during reproductive period in most of the years since 1993. Lethal effects could have occurred because of high temperatures in 2003 and 2005 (temperatures over 26°C) and low oxygen levels in 2006 (oxygen saturation under 50 % O₂ sat). No combined effects were observed using this method.

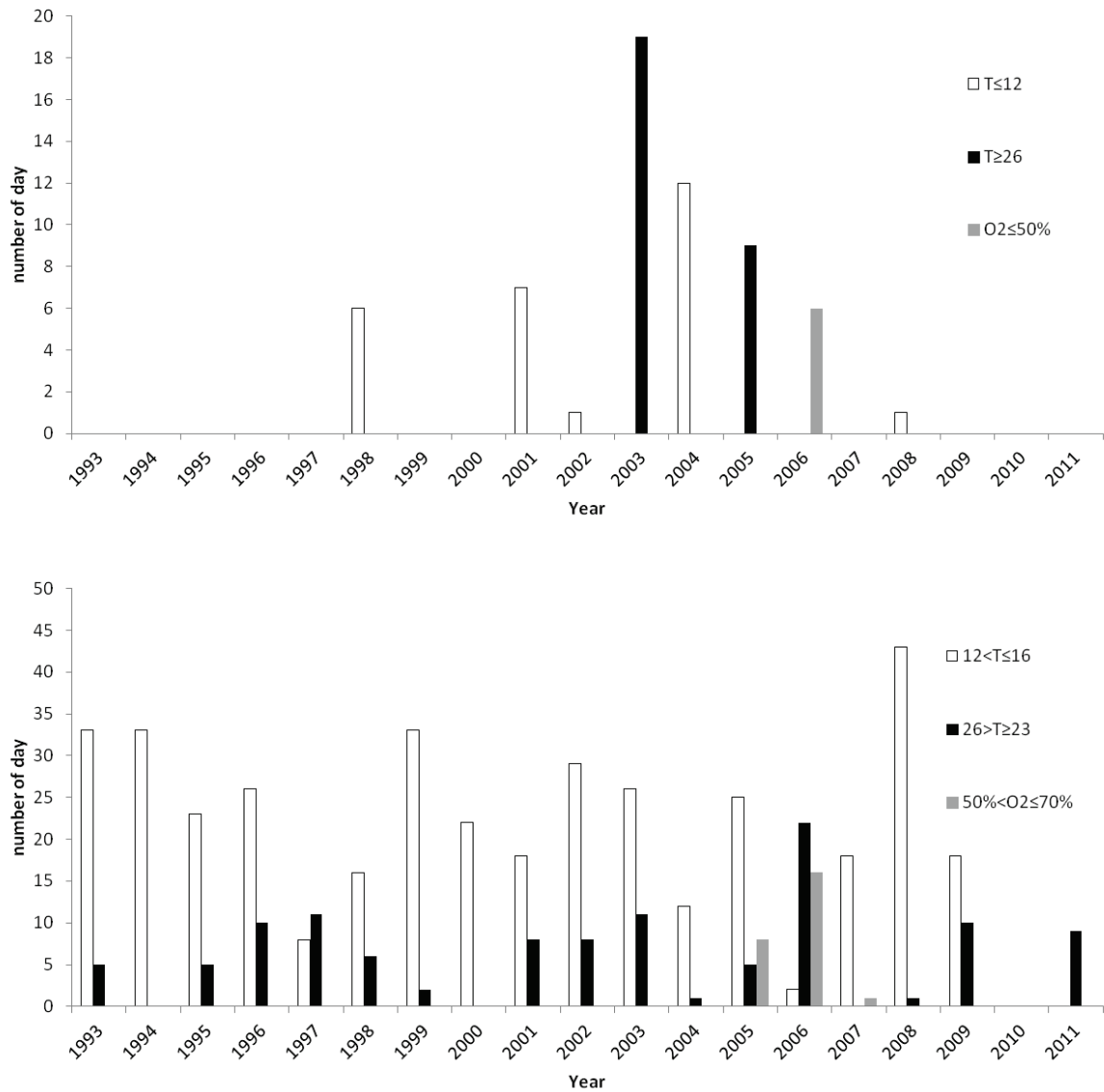


Figure 28: Number of days for which the daily mean was included in tolerance range (bottom) and exceed critical (up) limits for European sturgeon during their breeding period (May-June). No data concerning oxygen were available for the 1993-2004 period. Temperature data were collected from MAGEST consortium (Portets and Libourne) and MIGADO association (Golfech and Tuilières) in four sites located downstream in Garonne and Dordogne rivers. Oxygen saturation data were from MAGEST consortium (Portets and Libourne) in two sites located downstream in the Garonne and Dordogne rivers.

Current conditions in terms of temperature and oxygen levels measured in the Gironde-Garonne-Dordogne catchment during the European sturgeon's breeding period would appear to be conducive to the survival and early development of the species (Figure 28, page 80). These conclusions are consistent with those of Lassalle et al. (2010b), who used different criteria in a large scale analysis to evaluate the sustainability of the Garonne river until 2100. Actually, the high temperature conditions during spring and summer 2003 and 2005 and the high hypoxic event

frequency in the same period of 2005 were highly unfavourable to *A. sturio* embryonic development.

In the face of an imminent temperature rise due to global warming, there are two ways in which the reproduction process of European sturgeon may change. The first is that the breeding period could occur earlier than it does currently, as previously observed in their southern breeding area (Magnin, 1962). According to a previous study (Delage et al., 2014) this option would have a limited positive effect on their survival in the Gironde-Garonne-Dordogne basin, since juveniles are less sensitive than early life stages to temperature and oxygen variations. The other possibility is that the European sturgeon breeding period will remain unchanged. In this case, sturgeon early life stages would be subjected to higher temperatures and more intense or frequent hypoxic events than today. Development and hatching of young stages would be impacted, thus limiting recruitment and survival of the last remaining population of *Acipenser sturio* in the GGD basin. According to Lassalle et al. (2010b), the current European sturgeon repartition area could shift north in order to find conditions more suitable to their survival. In *Acipenser oxyrinchus* older stages, who spend their lives in the sea, it has been observed that when temperatures exceed their tolerance limit, they are able to return to freshwater in older stages to find cooler and more sustainable conditions (Chapman and Carr, 1995). European sturgeon could exhibit the same kind of adaptative behaviour.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was funded by the Région Aquitaine, IRSTEA and the French National Research Agency (ANR CESA (Sturtop project, ANR-13-CESA-0018-01)). It was carried out as part of the Cluster of Excellence COTE.

BIBLIOGRAPHY

- Abe T., Sakamoto T. (2011) Embryonic development and larval behavior of the kissing loach (*Parabotia curta*): Adaptations to an ephemeral, hypoxic environment. *Ichthyological Research* 58:238-244.
- Acolas M.L., Castelnaud G., Lepage M., Rochard E. (2011) Chapter 10 Biological cycle and migrations, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 147-152.

- Burggren W.W., Pinder A.W. (1991) Ontogeny of cardiovascular and respiratory physiology in lower vertebrates. *Annual Review of Physiology* 53:107-135.
- Chapman F.A., Carr S.H. (1995) Implications of early life stages in the natural history of the Gulf of Mexico sturgeon, *Acipenser oxyrinchus desotoi*. *Environmental Biology of Fishes* 43:407-413.
- Claireaux G., Lefrançois C. (2007) Linking environmental variability and fish performance: Integration through the concept of scope for activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362:2031-2041.
- Dalla Via J., Van Den Thillart G., Cattani O., Cortesi P. (1998) Behavioural responses and biochemical correlates in *Solea solea* to gradual hypoxic exposure. *Canadian Journal of Zoology* 76:2108-2113.
- Darias M.J., Lan Chow Wing O., Cahu C., Zambonino-Infante J.L., Mazurais D. (2010) Double staining protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Journal of Applied Ichthyology* 26:280-285. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2010.01421.x.
- Delage N., Cachot J., Rochard E., Fraty R., Jatteau P. (2014) Hypoxia tolerance of European sturgeon (*Acipenser sturio* L., 1758) young stages at two temperatures. *Journal of Applied Ichthyology*:n/a-n/a. DOI: 10.1111/jai.12609.
- Detlaf T.A., Ginzburg T.A., Shmal'gauzen O.I. (1981) Development of sturgeon: egg maturation, fertilization, embryonic and prelarval development. Nauka Publishers, Moscow:224 pp.
- Domenici P., Lefrançois C., Shingles A. (2007) Hypoxia and the antipredator behaviours of fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362:2105-2121.
- Elshout P.M.F., Dionisio Pires L.M., Leuven R.S.E.W., Wendelaar Bonga S.E., Hendriks A.J. (2013) Low oxygen tolerance of different life stages of temperate freshwater fish species. *Journal of Fish Biology* 83:190-206.
- Fry F.E.J. (1971) *Fish physiology* Academic press, New York.
- Gisbert E., Cech Jr J.J., Doroshov S.I. (2002) Routine metabolism of larval green sturgeon (*Acipenser medirostris* Ayres). *Fish Physiology and Biochemistry* 25:195-200.
- Hassell K.L., Coutin P.C., Nuggeoda D. (2008a) Hypoxia, low salinity and lowered temperature reduce embryo survival and hatch rates in black bream *Acanthopagrus butcheri* (Munro, 1949). *Journal of Fish Biology* 72:1623-1636.

- Hassell K.L., Coutin P.C., Nuggeoda D. (2008b) Hypoxia impairs embryo development and survival in black bream (*Acanthopagrus butcheri*). *Marine Pollution Bulletin* 57:302-306.
- IPCC. (2013) *Climate change 2013 The physical science basis Summary for policymakers*.
- Johnson S.C., Chapman G.A., Stevens D.G. (1989) Relationships between temperature units and sensitivity to handling for coho salmon and rainbow trout embryos. *The Progressive Fish-Culturist* 51:61-68.
- Johnston I.A., Lee H.T., Macqueen D.J., Paranthaman K., Kawashima C., Anwar A., Kinghorn J.R., Dalmay T. (2009) Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: Genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes. *Journal of Experimental Biology* 212:1781-1793.
- Kappenman K.M., Webb M.A.H., Greenwood M. (2013) The effect of temperature on embryo survival and development in pallid sturgeon *Scaphirhynchus albus* (Forbes & Richardson 1905) and shovelnose sturgeon *S. platyrhynchus* (Rafinesque, 1820). *Journal of Applied Ichthyology*.
- Kieffer J.D., Baker D.W., Wood A.M., Papadopoulos C.N. (2011) The effects of temperature on the physiological response to low oxygen in Atlantic sturgeon. *Fish Physiology and Biochemistry* 37:809-819. DOI: DOI 10.1007/s10695-011-9479-y.
- Killen S.S., Marras S., Metcalfe N.B., McKenzie D.J., Domenici P. (2013) Environmental stressors alter relationships between physiology and behaviour. *Trends in Ecology and Evolution* 28:651-658.
- Lassalle G., Crouzet P., Gessner J., Rochard E. (2010) Global warming impacts and conservation responses for the critically endangered European Atlantic sturgeon. *Biological Conservation* 143:2441-2452.
- Lefrançois C., Domenici P. (2006) Locomotor kinematics and behaviour in the escape response of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., exposed to hypoxia. *Marine Biology* 149:969-977.
- Lepage M., Rochard E. (2011) Chapter 22 Fishery by-catch of European sturgeon in the Bay of Biscay in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 335-342.

- Lo K.H., Hui M.N.Y., Yu R.M.K., Wu R.S.S., Cheng S.H. (2011) Hypoxia Impairs Primordial Germ Cell Migration in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Plos One* 6. DOI: e2454010.1371/journal.pone.0024540.
- MAGEST. (2011) <http://www.magest.u-bordeaux1.fr>.
- Magnin E. (1962) Recherches sur la systématique et la biologie des Acipensérédés. *Annales de la Station Centrale d'Hydrobiologie Appliquée* 9:7-242.
- Mueller C.A., Joss J.M.P., Seymour R.S. (2011) The energy cost of embryonic development in fishes and amphibians, with emphasis on new data from the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 181:43-52. DOI: 10.1007/s00360-010-0501-y.
- Mustafa S.A., Al-Subiai S.N., Davies S.J., Jha A.N. (2011) Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Ecotoxicology* 20:1455-1466.
- Nicholson G., Jenkins G.P., Sherwood J., Longmore A. (2008) Physical environmental conditions, spawning and early-life stages of an estuarine fish: Climate change implications for recruitment in intermittently open estuaries. *Marine and Freshwater Research* 59:735-749.
- Pörtner H. (2001) Climate change and temperature-dependent biogeography: Oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften* 88:137-146.
- Rabalais N.N., Díaz R.J., Levin L.A., Turner R.E., Gilbert D., Zhang J. (2010) Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. *Biogeosciences* 7:585-619.
- Richards J.G. (2011) Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *Journal of Experimental Biology* 214:191-199.
- Rochard E. (2011) Chapter 18 Present legal status of the European sturgeon *Acipenser sturio*, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 251-256.
- Rochard E., Lepage M., Meauze L. (1997) Identification et caractérisation de l'aire de répartition marine de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* à partir de déclarations de captures. *Aquatic Living Resources* 10:101-109.
- Rochard E., Lepage M., Dumont P., Tremblay S., Gazeau C. (2001) Downstream migration of juvenile European sturgeon *Acipenser sturio* L. in the Gironde estuary. *Estuaries* 24:108-115.

- Rombough P.J. (1988) 2 Respiratory Gas Exchange, Aerobic Metabolism, and Effects of Hypoxia During Early Life. *Fish physiology* 11:59-161.
- Shang E.H.H., Wu R.S.S. (2004) Aquatic hypoxia is a teratogen and affects fish embryonic development. *Environmental Science and Technology* 38:4763-4767.
- Shazili N.A., Pascoe D. (1986) Variable sensitivity of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and alevins to heavy metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 36:468-474.
- Spitsbergen J.M., Tsai H.W., Reddy A., Miller T., Arbogast D., Hendricks J.D., Bailey G.S. (2000) Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by two exposure routes at different developmental stages. *Toxicologic Pathology* 28:705-715.
- Wang Y.L., Binkowski F.P., Doroshov S.I. (1985) Effect of temperature on early development of white and lake sturgeon, *Acipenser transmontanus* and *A. fulvescens*. *Environmental Biology of Fishes* 14:43-50.
- Williot P., Castelnaud G. (2011) Chapter 20 Historic overview of the European sturgeon *Acipenser sturio* in France: surveys, regulations, reasons for the decline, conservation, and analysis, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio L., 1758*, Springer. pp. 285-308.
- Williot P., Rochard E., Desse-Berset N., Gessner J., Kirschbaum F. (2011) Chapter 1 Brief introduction to sturgeon with a special focus on the European sturgeon, *Acipenser sturio* L. 1758, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio L., 1758*, Springer. pp. 3-12.
- Wu R.S.S. (2002) Hypoxia: From molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin* 45:35-45.

II. Synthèse des résultats et lien avec le chapitre n°3

Les données présentées dans cette publication permettent d'établir la sensibilité des très jeunes stades d'esturgeon européen vis-à-vis de la température et de la disponibilité en oxygène. Il apparaît que les stades embryo-larvaires sont particulièrement sensibles à une chute de la disponibilité en oxygène (absence d'éclosion dès 50 % O₂ sat). Dès 70 % O₂ sat, les premiers effets sublétaux se manifestent notamment sur le métabolisme aérobie. La sensibilité de l'espèce semble plus faible vis-à-vis de la température. Les données montrent un optimum thermique de l'espèce autour de 20°C et une limite supérieure de tolérance entre 26 et 30 °C. Malgré la large gamme de température testée, la limite inférieure de tolérance n'a pas été atteinte. Celle-ci se situe en dessous de 12 °C. Les premiers effets sublétaux liés à la température sont observés en deçà de 16 et au delà de 23 °C.

Sur la base des observations de température et de saturations en oxygène, relevés dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne, la survie et le développement des très jeunes stades d'esturgeon européen ne semble pas menacés. Il est intéressant de constater que pour la période considérée *a priori* le nombre de journées pour lesquelles une température inférieure à 16°C, c'est à dire induisant des effets sublétaux, est supérieure au nombre de journées pour lesquelles la température dépasse les 23°C. Ainsi, si le réchauffement du climat entraîne une augmentation du nombre de journées chaudes, il entraînera également une augmentation du nombre de jours pour lesquels les températures seront favorables au développement des jeunes stades d'esturgeon européen.

La sensibilité des jeunes stades de poissons aux facteurs environnementaux est connue pour diminuer avec l'âge (Ishibashi et al., 2005). La migration vers l'estuaire des juvéniles d'esturgeon se fait vers l'âge de trois mois, après quoi, la croissance se déroule dans les eaux saumâtres de l'estuaire de la Gironde. Cette migration implique nécessairement un passage par le bouchon vaseux. Le bouchon vaseux est une zone répartie entre la Gironde, la Dordogne aval et la Garonne aval qui connaît de fortes chutes de saturation en oxygène. Bien que celui-ci soit présent tout au long de l'année, sa localisation ainsi que le niveau d'oxygène de cette zone est fluctuant en fonction de la saison. Les plus fortes chutes du niveau d'oxygène de cette zone sont enregistrées en été. Ainsi, la mesure de la sensibilité des juvéniles de trois mois à la diminution de l'oxygène disponible est un élément clé à considérer pour le maintien de l'espèce dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne.

CHAPITRE 3 : EVOLUTION DE LA TOLERANCE A
L'HYPOXIE DES JEUNES STADES D'ESTURGEON
EUROPEEN A DEUX TEMPERATURES DIFFERENTES
EN FONCTION DE L'AGE

I. Préambule

Le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne comprend une zone de turbidité maximum (le bouchon vaseux) où des problèmes de diminution drastique de la concentration en oxygène ont été rapportés de façon récurrente (Lanoux et al., 2013). La dimension de cette zone et l'importance de la diminution en oxygène est variable en fonction de la saison et du cycle de marée (par augmentation du temps de résidence de l'eau et de la matière en suspension). La charge en particules en suspension dans cette zone varie entre 50 et 500 g.L⁻¹. Des problèmes d'anoxie ont été relevés, en fonction de la zone du bouchon vaseux considérée, dès 50 à 140 g.L⁻¹. A son étendue maximale, cette zone s'étend de 50 km en aval à 70 km en amont de Bordeaux (Abril et al., 1999). Du fait de la diminution de débit du fleuve, un déplacement de cette zone de turbidité maximale vers l'amont a été constaté (Sottolichio et al., 2013).

Chez l'esturgeon européen, l'exposition a des teneurs variables en oxygène peut se manifester au stade embryo-larvaire, du fait de la faible mobilité de ce stade, et au stade juvénile. En effet, lors de la migration pour rejoindre l'estuaire, les juvéniles auront à traverser le bouchon vaseux. Cette première migration intervient vers l'âge de trois mois, c'est à dire entre les mois d'août et septembre au minimum et plus vraisemblablement au cours de leur premier hiver (données non publiées). La température de l'eau de la partie aval du bassin de Gironde-Garonne-Dordogne à cette époque de l'année reste relativement haute ($18,5 \pm 0,15$ °C à Libourne et $19,58 \pm 0,16$ °C à Portets en moyenne journalière \pm SE en septembre et octobre). Des premiers éléments sur la sensibilité de ce stade sont donnés dans ce troisième chapitre.

Il est généralement admis que la tolérance des jeunes stades de poissons vis-à-vis des facteurs environnementaux n'est pas identique selon le stade de développement (Barron et al., 2004; Incardona et al., 2013). Un accroissement des capacités osmorégulatrices, et donc de la tolérance à la salinité, a été observé entre le stade embryo-larvaire et le stade juvénile chez différents téléostéens (Hwang, 1987; Jurss and Bastrop, 1995). Il en va de même pour la tolérance à l'hypoxie chez *Pagrus major* pour lequel la plus faible valeur est obtenue au stade larvaire (Ishibashi et al., 2005).

Afin d'évaluer l'effet de la température et de l'oxygène sur les premiers stades de développement, des individus de trois mois et des embryons et larves ont été exposés à des températures de 20 et 25-26 °C. De manière à être le plus proche possible des conditions environnementales, l'exposition des stades embryo-larvaires à la diminution en oxygène a été effectué de façon statique pendant 48 heures (correspondant à la plus longue période continue de diminution d'oxygène observée) à des niveaux de saturation de 90, 50 et 30 % O₂ sat. Chez les juvéniles l'étude de la sensibilité à l'hypoxie a été réalisée sous forme de challenges hypoxiques à

Chapitre 3 : Evolution de la tolérance à l'hypoxie des jeunes stades d'esturgeon européen à deux températures différentes en fonction de l'âge

partir de 70 % O₂ sat et en diminuant graduellement ce taux. La tolérance des juvéniles à l'hypoxie a été suivi pendant toute la durée de l'expérimentation en se basant sur des critères comportementaux (nage altérée) et physiologiques (fréquence des battements operculaires et mort de l'individu).

Article n°2 : Hypoxia tolerance of European sturgeon (*Acipenser sturio*) young stages at two temperatures⁶

By N. Delage^{1,2}, J. Cachot², E. Rochard¹, R. Fraty¹, P. Jatteau¹

¹*Aquatic Ecosystems and Global Changes Research Unit, IRSTEA EABX, Cestas, France;*

²*University of Bordeaux, UMR CNRS EPOC, Talence, France*

SUMMARY

European sturgeon's sensitivity to oxygen depletion at two different temperatures was evaluated with embryos, from fertilization to hatching time, exposed to 90% O₂ saturation (% O₂ sat), 50% O₂ sat and 30% O₂ sat at 20 and 26°C and three-month-old juveniles (Lt 12 cm - W 7.3 g) exposed to oxygen challenge from 70% O₂ sat to 10% O₂ sat at 20 and 25°C. Parameters measured included embryonic survival rate (ESR) and hatch rate (HR) while in juveniles, opercular beats frequency (OBF), altered swimming behaviour, loss of equilibrium (LOE) and death, were recorded. ESR did not differ between oxygen saturation levels for a single temperature but decreased between 20 and 26°C from respectively 60.7% to 21.4% survival (Mean). No hatch was observed in embryos exposed to oxygen depletion at 50 and 30% O₂ sat, regardless of temperature. The HR was lower at 26°C (Mean 15.4%) than at 20°C (75.8%) at 90% O₂ sat. In embryos, all three oxygen concentrations allowed embryonic survival at the tested temperatures but were insufficient for increased activity such as hatching except at 20°C and 90% O₂ sat. In juveniles, OBF peaked at 40% O₂ sat at 212 beats per minute at 25°C and at 40-30% O₂ sat at 182-183 beats per minute at 20°C. For LOE and death no significant differences were observed with regard to oxygen saturation at 20 and 25°C. Altered swimming behaviour appeared at a significantly higher oxygen saturation at 25°C (43.5%) compared to 20°C (34.5%). Anaerobic metabolism is initiated after the OBF peak, which would represent a PO₂crit for European sturgeon juveniles under 30% and 40% at 20°C and 25°C respectively. Temperature increase also adversely affected the threshold of altered swimming behaviour which could be considered as a behavioural indicator of metabolic stress. The probability that embryos but not juveniles being exposed to harmful temperatures and hypoxic conditions is a real threat today in the Gironde catchment.

⁶ Publié dans Journal of Applied Ichthyology ; DOI : 10.1111/jai.12609 ; ISSN : 1439-0426

INTRODUCTION

Environmental changes can be critical for the survival of endangered species such as the European sturgeon *Acipenser sturio*. Although historically present in most large European catchments (Lassalle et al., 2010b), *A. sturio* populations decreased dramatically during the 20th century due to human activities (Lepage et al., 2000b; Williot et al., 2002) with only a single wild population existing in the Gironde Garonne Dordogne (GGD) basin (Williot and Castelnaud, 2011; Williot et al., 2011b). A restoration program was launched with stocking operations managed in the GGD basin. To date more than 1.6 million young fish have been released since 2007 (Acolas et al., 2012). During their downstream migration, juveniles have to cross a maximum turbidity zone (MTZ) where sediment particular matter exceeds hundreds of g.L⁻¹ near the sediment layer (Sottolichio and Castaing, 1999). This high turbidity area temporarily leads to hypoxic conditions at both diurnal and neap-tide time scale (Abril et al., 1999) by decreasing the gas exchange between air and water (Abril et al., 2009). Between 1962 and 1994, the MTZ moved upstream (Sottolichio et al., 2013) in response to the decreased river flow.

Mean air surface temperature on earth rose $0.85 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ over the period 1880 to 2012 and according to RCP (Representative Concentrations Pathways) scenarios, projections expect an increase of 1.1 to 4.8°C by the end of the 21st century (IPCC, 2013). Around 2050, warmer temperatures (between 0.5 and 3.5°C) can be expected in South-West France, in conjunction with a dryer climate and lower stream flow in summer (Stahl et al., 2010; Sauquet and Catalogne, 2011). As a result severe hypoxia events are expected to increase in the upstream part of the Gironde estuary (Lanoux et al., 2013). Model projections concerning the effects of increasing temperatures and altered precipitations on the suitability of river catchments for sturgeons were carried out by Lasalle et al. (2010). The present study targeted in order to provide more detailed background data on the tolerance of *A. sturio* embryo-larval and juvenile stages to temperature and oxygen concentrations. The effect of high temperatures has been studied in other sturgeon species (Niklitschek and Secor, 2009; Silvestre et al., 2010; Linares-Casenave et al., 2013), but no study has been carried out on hypoxia tolerance in relation to temperature in sturgeon. Moreover, there are very few studies about tolerance to hypoxic stress in fish from the larval to the juvenile stages (Ishibashi et al., 2005).

Both embryo-larvae and juveniles could be impacted by elevated temperatures and low oxygen levels during their stay in freshwater habitats. The aim of this study was to simulate relevant temperature and hypoxia conditions that embryo-larvae and juveniles could encounter nowadays

in the GGD basin in order to determine stage- sensitivity specificity to these two major environmental parameters. A scenario have been established to simulate putative conditions in the coming years according to IPCC (2007).

MATERIAL AND METHODS

Two distinct protocols were performed, one for embryos and larvae and one for juveniles. Because of its conservation status, experiments on *A. sturio* are subjected to regulation minimizing the number of juveniles available for experiments. A behavioural approach was chosen for the experiment, reducing the necessary number of individuals required compared to an experiment on survival. On the other hand Embryos and larvae before total resorption of yolk sac are not covered by the EU's regulation on animal testing (2010/63/EU) and can be used in higher numbers for acute toxicity assays.

Biological material

A. sturio embryos (5066 individuals) and juveniles (36 individuals) were obtained from assisted reproductions of the French ex-situ broodstock (Williot et al., 2011c). Gametes of two different genetic crosses were collected from spawners after hormonal stimulation (Williot and Chèvre, 2011). In the experiment using juvenile fish, larvae were reared at 18°C and were fed *Artemia nauplii* for three weeks following hatching and then blood worms until the experiments were carried out.

Embryonic exposure

Oxy-thermal conditions

Temperature and oxygen saturation data for the GGD were provided by the Migado Association (1993-2008) and the Magest consortium (2005-2011) (<http://www.magest.u-bordeaux1.fr>) for stations located upstream and downstream of the sturgeon spawning areas in the Garonne and the Dordogne rivers respectively.

Embryos used in this study were aged from fertilized eggs (stage 1) to hatched larvae (stage 31) according to Dettlaff et al. (1993). Since embryos depend on cutaneous respiration with low gas exchange due to their limited surface area (Rombough, 1988a), 90% O₂ sat was considered as the acceptable limit to prevent adverse effects on embryos.

Considering the historical reproduction period of the European sturgeon in this basin in May and June (Magnin, 1962), two temperatures (mean and max values observed in the GGD basin) and three oxygen saturation values were selected (90% O₂ sat, min observed 50% O₂ sat, and minimum expected value considering a 2°C increase in temperature 30% O₂ sat). Altogether, six oxy-thermal conditions were tested (Table 5). Duration of hypoxia was limited to 48 hours in order to reproduce events observed in the wild during the sturgeon's incubation period.

Table 5: Exposure conditions selected for experiments with European sturgeon larvae and juveniles. Temperature and oxygen saturation were combined to obtain six oxy-thermal conditions.

| | Observed mean | Observed extreme | Scenario |
|--------------------|---------------|------------------|-----------------------|
| T°C | 20°C | 26°C | 30°C (data not shown) |
| O ₂ sat | 90% | 50% | 30% |

Exposure design

An original incubator of 1 L in polyethylene terephthalate glycol-modified was designed for this experiment, with a bottom up water flow through a stainless steel floor grid where the embryos adhered (Fig 29, page 93). Six 45 L buffer tanks of dechlorinated tap water (Fig. 30, page 94), corresponding to the six conditions tested, were thermally controlled throughout the experiment using thermistors (Shego 200W) and chillers (TECO TC10). Oxygen saturation was maintained by adding O₂ and N₂. Moderated carbon dioxide bubbling was used to establish a stable pH at 7.63 ± 0.03 (mean \pm SE). Conditions were established and controlled automatically using a parameter control and recorder unit (SOFREL, S550, LACROIX) and real time data were collected from oxygen and pH probes (respectively WTW FDO IQ Sensor and WTW SensoLyt 700IQ). Temperature and oxygen saturation levels were controlled and recorded every two minutes.

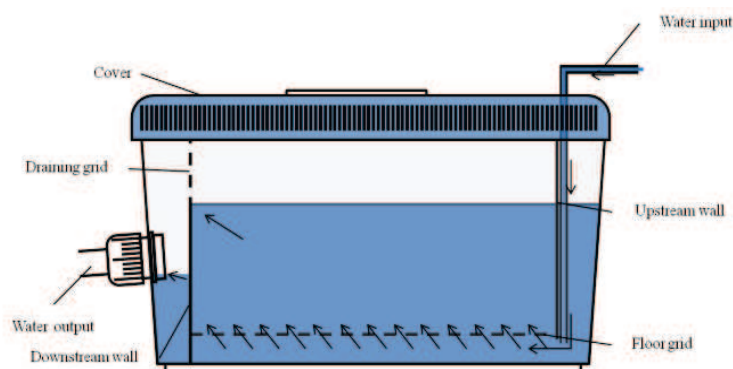


Fig 29. Incubators to rear and expose sturgeon eggs to the desired conditions. Arrows = water flow direction

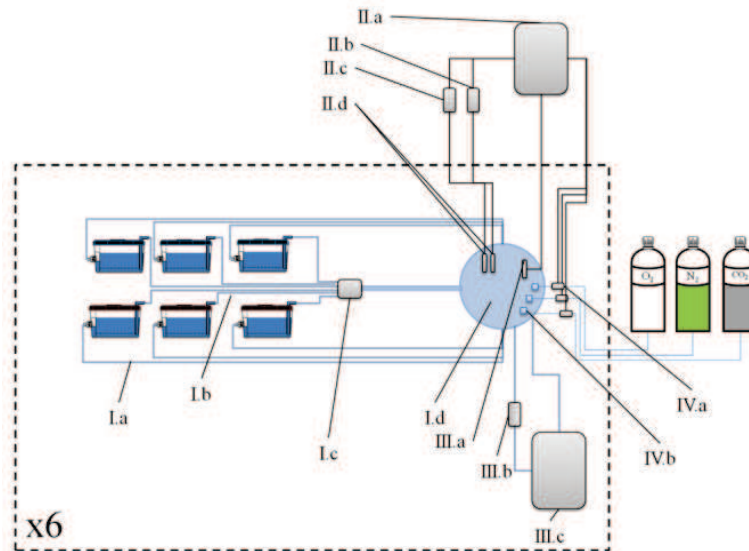


Fig. 30. Exposure system for a single condition for embryo and larvae experiment. I.a: feedback circuit; I.b: supply circuit; I.c: peristaltic pump; I.d: buffer tank. II.a: control and recorder units; II.b: pHmeter; II.c: oxymeter; II.d: pH and oxygen probes. III.a: thermistor; III.b: UV lamp; III.c: chiller. IV.a: electrovalve; IV.b: diffusor.

Water was added by peristaltic pumps delivering 34 mL.min⁻¹ corresponding to two incubator volume renewals per hour. Each buffer tank filled six incubators and outflow was collected in the buffer tank. Every day, 10% of the total volume of each system was replaced.

Experimental procedure

Egg fertilization and handling were performed at 18°C (gamete collection temperature). Immediately after fertilization, each egg batch from a single genetic cross (150 eggs) was placed in an incubator. Because of egg adhesiveness occurring within 4 min after fertilization, eggs were separated from one another before being stuck on the stainless steel grid. During the whole experimentation period a 12h light/12h dark cycle was maintained. Each of the six oxy-thermal conditions was tested in triplicate for each genetic cross (36 batches). Both genetic crosses were tested simultaneously to determine parental effects.

After fertilization, the water temperature was gradually increased at the rate of 1°C per hour to reach the targeted exposure temperature of 20°C and 26°C. Embryos were exposed to these temperatures for 15 days. Once the exposure temperature was reached, hypoxia exposure was initiated to reach the targeted O₂ level (30% O₂ sat, 50% O₂ sat and 90% O₂ sat). Hypoxic conditions were maintained from 12 hours post fertilization (hpf) to 60 hpf, then oxygen levels were increased, at a rate of 10% per hour, to reach 90% O₂ sat in all incubators in 4 to 6 hours.

Hatch rate (HR) for each incubator was recorded every two hours from the first hatching event and up to 12 hours after the last one. Dead embryos were counted and removed every day in order to evaluate mortality.

Mortality during the first day of the experiment was not taken into account, because it may have been due to handling and unfertilized oocytes. ESR was calculated by using the number of living larvae for each condition and each genetic cross. HR was evaluated and compared between conditions and between genetic cross.

Juvenile exposure

The closed system was filled with well-water of constant quality (pH=7.8; conductivity=420 μ S.cm⁻¹). Four 14 L experimental tanks (3 hypoxic challenges and 1 control) were supplied with oxygen and temperature-controlled water (Fig. 31, page 96). Temperature and oxygen levels were maintained as described above.

Three-month-old juveniles (Lt 12 ± 0.1 cm – W 7.3 ± 0.3 g) were exposed to a gradually decreasing oxygen level (Fig. 32, page 96), following a similar approach to determine the Critical Thermal Limit (CTL) (Becker and Genoway, 1979) and critical swimming speed (U-Crit) (Plaut, 2001; Cai et al., 2013).

Seccor and Gunderson (1998a) set their normoxic condition to 75% O₂ sat in their study on hypoxia tolerance of juvenile Atlantic sturgeon. In our preliminary test no behavioural modification was observed in juveniles of European sturgeon exposed to 70% O₂ sat for two hours, this oxygen level was therefore selected as a control level for the juvenile experiment.

Three individuals were introduced into each tank and acclimated for 60 min at 70% O₂ sat while the control tank was maintained at 70% O₂ sat throughout the experiment. All experimental tanks were hermetically covered to prevent O₂ diffusion via the water surface. An oxygen probe was set in one of the experimental tanks to record dissolved oxygen concentration. Differences were noted towards the end of the experiments where low levels of oxygen were recorded. A time-lag of around 5 min was observed to reach the targeted concentration. Minimum O₂ levels reached were 11 and 12% at 20 and 25°C respectively.

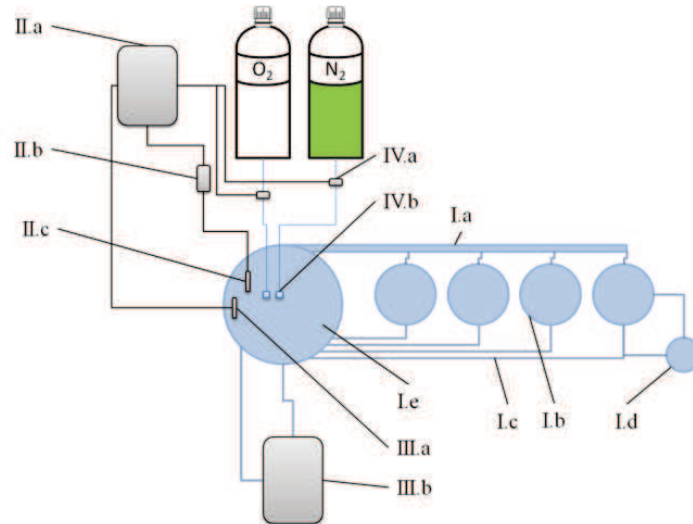


Fig. 31. Exposure system for oxygen challenge in experiments with juveniles. I.a: supply circuit; I.b: experimental tank; I.c: feedback circuit; I.d: regulation tank for control condition; I.e: water-tower. II.a: control and recorder units; II.b: oxymeter; II.c: oxygen probe. III.a: thermistor; III.b: chiller. IV.a: electrovalve; IV.b: diffusor.

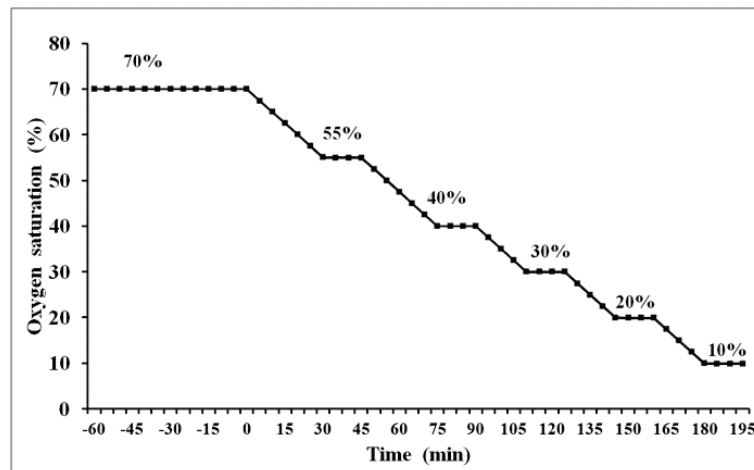


Fig. 32. Decrease in oxygen saturation of rearing water in the closed circuit during the experiment on juveniles.

Three replicated experiments were performed for each temperature tested. Before each experiment, 12 fish were caught from the rearing tank (18°C) and placed in a 30 L aquarium at 20°C for temperature acclimation for 20 min. For the hypoxic test at 20°C, fish were placed directly in the 4 experimental tanks. For tests at 25°C, fish were placed successively in aquaria at 22 and 24°C for 20 min. At the end of the last step, fish were allocated to the 4 experimental tanks at 25°C. Video recordings lasting at least 15 seconds were made in each tank, during each oxygen level step. Opercular beats were counted from these video recordings for one to two different fish per tank, in order to calculate the opercular beats frequency (OBF).

Response to hypoxia was characterized according to 3 indicators: altered swimming, loss of equilibrium (LOE) and death. Jerky (erratic) swimming and picking air at the surface were

regarded as visual signs of altered behaviour. LOE is an expression of functional and metabolic disturbances, preventing fish from escaping danger (Beitinger et al., 2000). Loss of equilibrium would determine the lower limit of O₂ level to preserve the likelihood of fish survival. LOE was recorded when fish adopted an oblique swimming position or if they were rolling. Death was recorded when the opercular beats stopped.

Statistics

Statistical analysis was performed using R software. Replicated conditions were considered as independent experiments. Data normality was checked using the Shapiro-Wilk test and equality of variance was verified using the Bartlett test. In the case of a normal distribution of data and equality of variance, an analysis of variance was performed (ANOVA) followed by a Tukey post hoc test. When one of these criteria was not respected, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed, followed by a Wilcoxon test for the embryo-larval experiment.

RESULTS

Embryonic experiment

Genetic crosses did not show any significant difference in HR (Table 6) independently of exposure conditions (Wilcoxon test, $p=0.776$). In contrast, a significant difference in survival rate was observed between tested conditions (Wilcoxon test, $p=0.008$).

Hatch rate (HR)

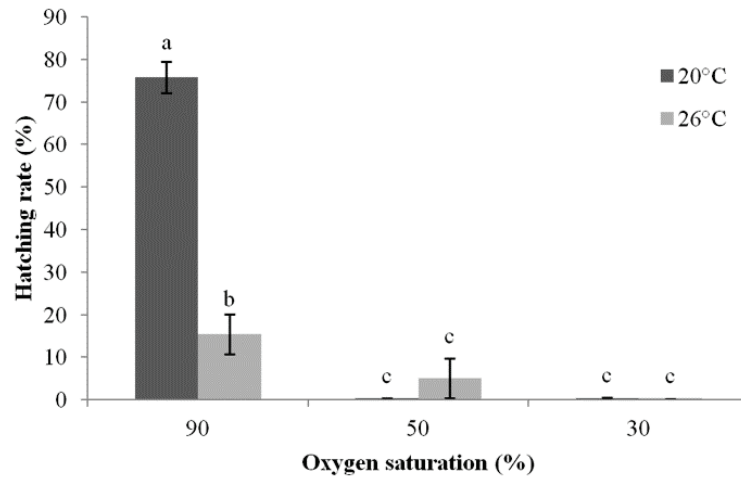


Fig. 33. Hatch Rate (HR) (mean + SE) of *A. sturio* embryos as a function of temperature and oxygen saturation levels. Letters indicate significant differences between O₂ conditions (KW tests) performed for a same temperature (N=6 replicates per condition).

At 30% O₂ sat and 50% O₂ sat, whatever the temperature condition considered, the HR was close to 0%. At 90% O₂ sat there was a drastic decrease in HR between 20 and 26°C (Fig. 33, page 98) which collapsed from 75.8±3.7% at 20°C to 15.4±4.7% at 26°C. Hatching time 50% at 20°C was 104.5±3.1 hpf and 78.9±3.7 hpf at 26°C. The Wilcoxon test showed a significant difference between conditions ($p < 0.002$).

Embryonic survival rate (ESR)

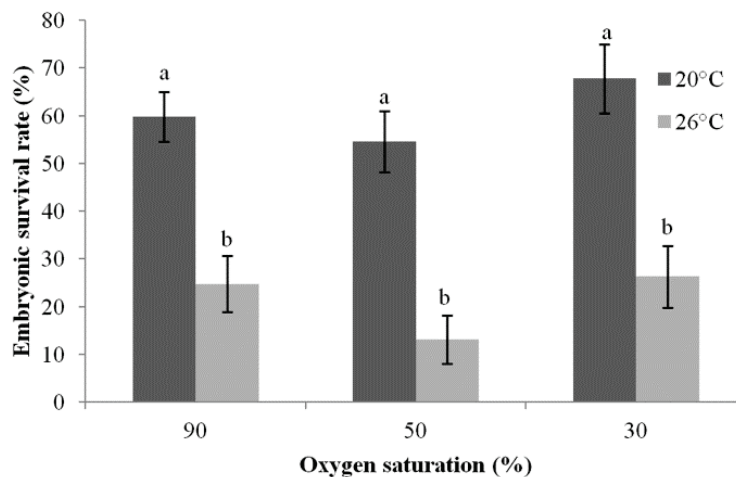


Fig. 34. Embryonic Survival Rate (ESR) (mean + SE) of *A. sturio* at 6dpf as a function of temperature and oxygen saturation levels. Letters indicate significant differences between O₂ conditions (KW tests) for a same temperature (N=6 replicates per condition).

For the same oxygen condition, the ESR was lower at 26 than at 20°C (Fig. 34, page 98). The Wilcoxon test highlighted that ESR differed significantly according to temperature conditions ($p=3.4 \times 10^{-7}$). In contrast, no significant difference was observed between the different O₂ conditions, whatever the temperature considered (Wilcoxon test, $p=0.262$ for 20°C and $p=0.236$ for 26°C) (Fig. 34, page 98).

Table 6: Genetic cross effects on hatching and survival on larvae.

| | Cross 1 | Cross 2 |
|---------|-----------|-----------|
| ESR (%) | 30.5±22.7 | 51.6±22.9 |
| HR (%) | 13.4±25.6 | 18.9±31.6 |

ESR, Embryonic Survival Rate; HR, Hatch Rate.

Juvenile experiments

At the temperatures tested, no change was recorded in OBF in the control tank (Fig. 35, page 100) that was maintained at 70% O₂ sat during the course of the experiment (KW, $p > 0.5$). At both temperatures, OBF in fish exposed to hypoxia was significantly different from that of the control fish (KW, $p=0$) except at 20% O₂ sat for 25°C ($p > 0.05$).

At 25°C at each oxygen stepwise reduction, OBF was higher in both hypoxia (Fig. 35, page 100) and control groups compared to the respective groups at 20°C (Mann-Whitney, $p=0$).

Regardless of temperature, OBF exhibited a similar pattern, increasing significantly with decreasing O₂ levels to 40% O₂ sat, and then significantly decreasing beyond this point (Mann Whitney U test, $p < 0.05$).

Whatever the temperature, fish in the control tank exhibited no significant modification of their survival and behaviour.

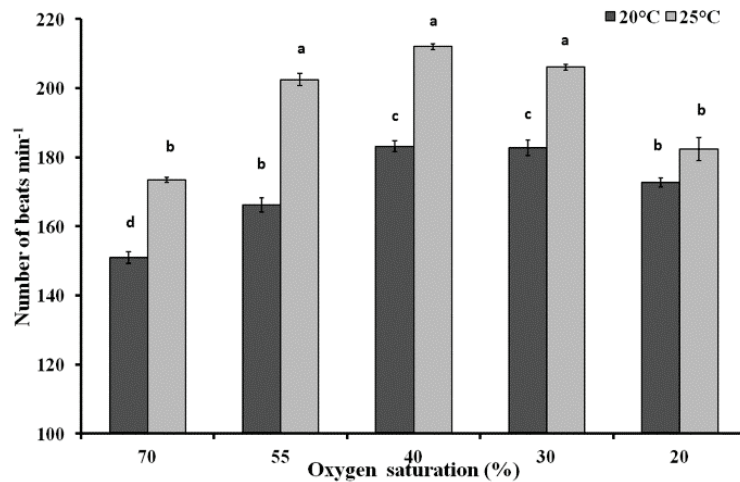


Fig. 35. Opercular Beats Frequency (OBF) of *A. sturio* juveniles (n=3) recorded at 20°C (mean \pm SE) at different levels of oxygen saturation. Letters indicate significant differences between oxygen saturation steps (Mann Whitney, $p < 0.05$) or within a temperature experiment (KW, $p < 0.05$).

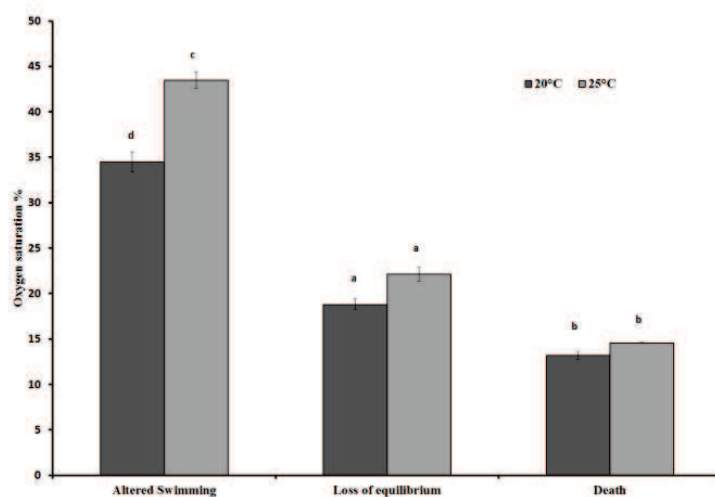


Fig 36: Threshold of appearance of adverse effects in *A. sturio* juveniles according to levels of oxygen saturation and temperature (mean \pm SE). Different letters indicate significant differences (Mann Whitney, $p = 0$, $n = 3$)

At 20°C, the first signs of erratic swimming were observed at $34.5 \pm 1.1\%$ O₂ sat (mean \pm SE) compared to $43.5 \pm 0.9\%$ O₂ sat at 25°C (Mann Whitney, $p = 0$), while no effect of temperature was recorded in the threshold of the appearance of LOE and death (Fig 36, page 100).

LOE appeared at $18.8 \pm 0.6\%$ O₂ sat and $22.1 \pm 0.7\%$ O₂ sat at 20 and 25°C respectively, and was significantly different for both temperatures from altered swimming and death which appeared at $13.2 \pm 1.4\%$ O₂ sat and $14.6 \pm 0.2\%$ O₂ sat 20 and 25°C respectively (Mann Whitney, $p = 0$). All surviving fish were fed a few hours after the experiments and no subsequent mortality was recorded.

DISCUSSION

In the context of global change, European sturgeon's young stages are going to be more and more exposed to drastic physico-chemical conditions during their fresh water life stage in the Gironde catchment basin. That lead us to address the tolerance of these stages to temperature and oxygen concentration.

Because of their different life history traits and habitat utilizations, embryonic developmental phases and juveniles are exposed to riverine conditions with high variations in temperatures and oxygen levels depending upon the location in the river (Abril et al., 1999; Travade and Carry, 2008).

The experimental device used for juveniles does not allow fish to use flight response. So reactions to hypoxia we observed, probably do not potentially occur in the wild since fish will escape when oxygen saturation is decreasing. Only 36 juveniles were used for this experimentation.

Embryonic phase

Lack of oxygen was reported to be a limiting factor for fish hatching (Rombough, 1988b). In *Acanthopagrus butcheri* exposed to hypoxia during the embryonic stage, no hatching was observed below 30% O₂ sat and a 100% mortality rate after 72h exposure below 55% O₂ sat (Hassell et al., 2008a). In *Coregonus lavaretus* and *Coregonus albula*, and in *Neoceratodus forsteri* exposure to hypoxia induced precocious hatching (Czerkies et al., 2001; Mueller et al., 2011b).

Whatever the indicator considered, an increase in temperature resulted in a negative impact. Early exposure to hypoxia had no immediate impact on embryonic survival but it did impair hatching success, and the effect of hypoxia seems to be delayed. It is interesting to note that at 20 and 26°C embryonic survival was not impacted by oxygen depletion regardless of oxygen level applied. It is well known that the embryonic oxygen consumption increase with temperature (Barrionuevo and Burggren, 1999). In *Oncorhynchus mykiss*, an increase in energy expenditure was described during hatching (Ninness et al., 2006). Thus, at 26°C, oxygen concentration is likely insufficient to satisfy oxygen demand during the hatching process.

Juveniles

Considering Critical Thermal Maximum (CTM) between 33 and 35°C (Sardella et al., 2008; Zhang and Kieffer, 2014) and temperature range for optimal growth of different sturgeon species (*A. brevirostrum*, *A. medirostris*, *A. sinensis*) between 20 and 26.2°C (Ziegeweid et al., 2008; Feng et al., 2012), it is reasonable to assume that the two temperatures tested in this study were within the safety range for *A. sturio* juveniles too.

It has been shown here that ventilatory frequency is influenced by temperature, as a result of increased metabolism evidenced by the results of the control group at 20 and 25°C. This phenomenon is widely described (Issartel et al., 2005; Melzner et al., 2006) and offsets the decrease in oxygen saturation in water to maintain a constant blood PO₂.

The ventilatory frequency increases with the decrease in dissolved oxygen content in water until a threshold beyond which OBF decreases. This OBF response pattern has already been described in other sturgeon species categorized as oxyregulator (Ruer et al., 1987; Randall et al., 1992; Maxime et al., 1995; Kieffer et al., 2011). According to Nonnotte et al. (1993), anaerobic metabolism is initiated after the OBF peak, which would set the PO₂crit for European sturgeon juveniles under 30% O₂ sat and 40% O₂ sat at 20°C and 25°C respectively. Despite differences in the tested temperature range and in the body mass of the fish used, our results are in the range of data published for other sturgeon species (Nonnotte et al., 1993; McKenzie et al., 2007; Kieffer et al., 2011).

Hypoxia tolerance decreases with increasing temperature (Vaquer-Sunyer and Duarte, 2011 for a review), but our results did not clearly illustrate this relationship. Increased temperatures had only an effect on the appearance of the altered swimming threshold (erratic swimming, burst and glide) which could be considered as a behavioural indicator of metabolic stress. On the other hand, no influence of the temperature was recorded for LOE and death thresholds.

Khakimullin (1987) just mentioned LOE as a behavioural consequence of hypoxia, and to our knowledge there is no publication reporting LOE data in Acipenseridae subjected to hypoxia. Similar LOE threshold values have been reported in another acipenseriform fish, *Polyodon spathula* (Aboagye and Allen, 2014) and in Atlantic salmon juveniles (Barnes et al., 2011).

The experimental approach used in this study enabled us to assess hypoxic tolerance in *A. sturio* juveniles using two endpoints, LOE and death, which were both used because of the few references in the literature dealing with this aspect in sturgeon and more generally in fish. Taking into account the animal welfare and because of the threatened status of sturgeon with restricting number of individuals for experiments, we can propose to use LOE as a suitable endpoint to

qualify hypoxic tolerance in sturgeon juveniles. With these first behavioural results and following a conservative positioning, we can propose a safety threshold for sturgeon juveniles at 35 and 45 % O₂ Sat and a vital threshold at 19 and 22% O₂ Sat for 20 and 25°C respectively.

CONCLUSION

A temperature rise from 20 to 26°C had a drastic effect on embryonic survival and hatch rate of *A. sturio*. In juveniles, the effects were not as obvious as in the embryo-larval stage. Temperature had no effect on loss of equilibrium, and caused only a slight change in opercular beat frequency. According to theory, the tolerance of *Acipenser sturio* juveniles to elevated temperatures (25°C) seems higher than that of embryos.

Even with a moderate hypoxia (50% O₂ sat) during the first two days of embryonic development, there was a negative effect on hatch rate.

Embryo exposures to temperature and oxygen levels resulting from the IPCC forecasts could potentially cause adverse impacts on fish performances and fitness of the fish. Our data indicate that current summer superficial temperatures and oxygen levels in the Gironde-Garonne-Dordogne basin area real threat for the native population of European sturgeon. With temperatures forecasted to rise and an expected increase in hypoxic events, even for a short-term period, the restoration of *A. sturio* in the Gironde-Garonne-Dordogne basin is considered more difficult than initially expected. Concerning the juveniles, the current maximum turbidity zone with low oxygen contents in the lower river section of the Gironde-Garonne-Dordogne basin does not represent a serious threat. Administrative measures by the Bordeaux urban community to restrict organic matter discharges into the Gironde-Garonne-Dordogne basin, which causes hypoxic events, should have a significant impact on the establishment of the hypoxic zone (Lanoux et al., 2013), thus limiting its impact on the *A. sturio* juvenile stage.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is financially supported by the following bodies: Région Aquitaine, ANR (Agence Nationale pour la Recherche). Data were provided by MAGEST (MAGEST, Réseau de surveillance automatisée du système estuarien Garonne - Dordogne - Gironde) and the Migado association (Association migrateur Garonne Dordogne). This study has been carried out in the framework of the Cluster of Excellence COTE.

REFERENCES

- Aboagye, D.L.; Allen P.J., 2014: Metabolic and locomotor responses of juvenile paddlefish *Polyodon spathula* to hypoxia and temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology* a 169, 51-59.
- Abril, G.; Etcheber H.; Le Hir P.; Bassoullet P.; Boutier B.; Frankignoulle M., 1999: Oxic/anoxic oscillations and organic carbon mineralization in an estuarine maximum turbidity zone (The Gironde, France). *Limnology and Oceanography* 44, 1304-1315.
- Acolas, M.L.; Rouleau E.; Le barh R.; Bigot J.F.; ballion B.; Gesset C.; E. R., 2012: Suivi de la population d'esturgeons européens., in: M. L. Acolas (Ed.), Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio*; bilan scientifique et technique 2011. , Irstea, Bordeaux, pp. 24-32.
- Barnes, R.; King H.; Carter C.G., 2011: Hypoxia tolerance and oxygen regulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* from a Tasmanian population. *Aquaculture* 318, 397-401.
- Barrionuevo, W.R.; Burggren W.W., 1999: O₂ consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): Influence of temperature and ambient O₂. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 276, R505-R513.
- Becker, C.D.; Genoway R.G., 1979: Evaluation of critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. *Environmental Biology of Fishes* 4, 245-256.
- Beitinger, T.L.; Bennett W.A.; McCauley R.W., 2000: Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes* 58, 237-275.
- Cai, L.; Taupier R.; Johnson D.; Tu Z.; Liu G.; Huang Y., 2013: Swimming Capability and Swimming Behavior of Juvenile *Acipenser schrenckii*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 319A, 149-155.
- Czerkies, P.; Brzuzan P.; Kordalski K.; Luczynski M., 2001: Critical partial pressures of oxygen causing precocious hatching in *Coregonus lavaretus* and *C. albula* embryos. *Aquaculture* 196, 151-158.
- Dettlaff, T.A.; Ginsburg A.S.; Schmalhausen O.I., 1993: (Ed.)^(Eds.) Sturgeon Fishes, Developmental Biology, Aquaculture., Springer Verlag, Berlin, pp. Pages.

- Feng, G.; Zhuang P.; Zhang L.; Duan M., 2012: Effects of temperature on oxydative stress biomarkers in juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) under laboratory conditions. *Advanced Materials Research* 343-344, 497-504.
- Hassell, K.L.; Coutin P.C.; Nugegoda D., 2008: Hypoxia, low salinity and lowered temperature reduce embryo survival and hatch rates in black bream *Acanthopagrus butcheri* (Munro, 1949). *Journal of Fish Biology* 72, 1623-1636.
- IPCC. 2007: Climate change 2007: synthesis report. Contribution of working groups I, II and III to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva, Switzerland.
- IPCC. 2013: Climate change 2013 The physical science basis Summary for policymakers.
- Ishibashi, Y.; Inoue K.; Nakatsukasa H.; Ishitani Y.; Miyashita S.; Murata O., 2005: Ontogeny of tolerance to hypoxia and oxygen consumption of larval and juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 244, 331-340.
- Issartel, J.; Hervant F.; Voituron Y.; Renault D.; Vernon P., 2005: Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigean and hypogean crustaceans to different temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 141, 1-7.
- Khakimullin, A.A., 1987: Oxygen preferendum (preferred oxygen regime) of hatchery young of the Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*. *Journal of Ichthyology* 27, 111-115.
- Kieffer, J.D.; Baker D.W.; Wood A.M.; Papadopoulos C.N., 2011: The effects of temperature on the physiological response to low oxygen in Atlantic sturgeon. *Fish Physiology and Biochemistry* 37, 809-819.
- Lanoux, A.; Etcheber H.; Schmidt S.; Sottolichio A.; Chabaud G.; Richard M.; Abril G., 2013: Factors contributing to hypoxia in a highly turbid, macrotidal estuary (the Gironde, France). *Environmental Sciences: Processes and Impacts* 15, 585-595.
- Lassalle, G.; Crouzet P.; Gessner J.; Rochard E., 2010: Global warming impacts and conservation responses for the critically endangered European Atlantic sturgeon. *Biological Conservation* 143, 2441-2452.
- Lepage, M.; Rochard E.; Castelnaud G., 2000: Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 restoration and gravel extraction in the Gironde estuary. *Boletin - Instituto Espanol de Oceanografia* 16, 175-179.

- Linares-Casenave, J.; Werner I.; Van Eenennaam J.P.; Doroshov S.I., 2013: Temperature stress induces notochord abnormalities and heat shock proteins expression in larval green sturgeon (*Acipenser medirostris* Ayres 1854). *Journal of Applied Ichthyology* 29, 958-967.
- Magnin, E., 1962: Recherches sur la systématique et la biologie des Acipensérédés. *Annales de la Station Centrale d'Hydrobiologie Appliquée* 9, 7-242.
- Maxime, V.; Nonnotte G.; Peyraud C.; Williot P.; Truchot J.P., 1995: Circulatory and respiratory effects of an hypoxic stress in the Siberian sturgeon. *Respiration Physiology* 100, 203-212.
- McKenzie, D.J.; Steffensen J.F.; Korsmeyer K.; Whiteley N.M.; Bronzi P.; Taylor E.W., 2007: Swimming alters responses to hypoxia in the Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*. *Journal of Fish Biology* 70, 651-658.
- Melzner, F.; Bock C.; Portner H.O., 2006: Temperature-dependent oxygen extraction from the ventilatory current and the costs of ventilation in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Journal of Comparative Physiology B* 176, 607-621.
- Mueller, C.A.; Joss J.M.P.; Seymour R.S., 2011: Effects of environmental oxygen on development and respiration of Australian lungfish (*Neoceratodus forsteri*) embryos. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 181, 941-952.
- Niklitschek, E.J.; Secor D.H., 2009: Dissolved oxygen, temperature and salinity effects on the ecophysiology and survival of juvenile Atlantic sturgeon in estuarine waters: I. Laboratory results. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 381, Supplement, S150-S160.
- Ninness, M.M.; Stevens E.D.; Wright P.A., 2006: Energy expenditure during hatching in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63, 1405-1413.
- Nonnotte, G.; Maxime V.; Truchot J.P.; Williot P.; Peyraud C., 1993: Respiratory responses to progressive ambient hypoxia in the sturgeon, *Acipenser baeri*. *Respiration Physiology* 91, 71-82.
- Plaut, I., 2001: Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 131, 41-50.
- Randall, D.J.; McKenzie D.J.; Abrami G.; Bondiolotti G.P.; Natiello F.; Bolis L.; Agradi E., 1992: Effect of diet on response to hypoxia in sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Journal of Experimental Biology* 170, 113-125.

- Rombough, P.J., 1988a: Growth, aerobic metabolism, and dissolved-oxygen requirements of embryos and alevins of steelhead, *Salmo gairdneri*. Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie 66, 651-660.
- Rombough, P.J., 1988b: 2 Respiratory Gas Exchange, Aerobic Metabolism, and Effects of Hypoxia During Early Life. Fish physiology 11, 59-161.
- Ruer, P.M.; Cech Jr J.J.; Doroshov S.I., 1987: Routine metabolism of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: Effect of population density and hypoxia. Aquaculture 62, 45-52.
- Sardella, B.A.; Sanmarti E.; Kultz D., 2008: The acute temperature tolerance of green sturgeon (*Acipenser medirostris*) and the effect of environmental salinity. Journal of Experimental Zoology Part A-Ecological Genetics and Physiology 309A, 477-483.
- Sauquet, E.; Catalogne C., 2011: Comparison of catchment grouping methods for flow duration curve estimation at ungauged sites in France. Hydrology and Earth System Sciences 15, 2421-2435.
- Secor, D.H.; Gunderson T.E., 1998: Effects of hypoxia and temperature on survival, growth and respiration of juvenile Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*. Fishery Bulletin 96, 603-613.
- Silvestre, F.; Linares-Casenave J.; Doroshov S.I.; Kültz D., 2010: A proteomic analysis of green and white sturgeon larvae exposed to heat stress and selenium. Science of the Total Environment 408, 3176-3188.
- Sottolichio, A.; Castaing P., 1999: A synthesis on seasonal dynamics of highly-concentrated structures in the Gironde estuary. Comptes Rendus de l'Academie de Sciences - Serie IIa: Sciences de la Terre et des Planetes 329, 795-800.
- Sottolichio, A.; Hanquiez V.; Périnotto H.; Sabouraud L.; Weber O., 2013: Evaluation of the recent morphological evolution of the Gironde estuary through the use of some preliminary synthetic indicators. Journal of Coastal Research, 1224-1229.
- Stahl, K.; Hisdal H.; Hannaford J.; Tallaksen L.M.; Van Lanen H.A.J.; Sauquet E.; Demuth S.; Fendekova M.; Jodar J., 2010: Streamflow trends in Europe: Evidence from a dataset of near-natural catchments. Hydrology and Earth System Sciences 14, 2367-2382.
- Travade, F.; Carry L., 2008: Effet de la canicule de 2003 sur les poissons migrateurs en Garonne et dordogne - réflexions sur les effets des rejets thermiques de la centrale nucléaire de Golfech sur la Garonne. Hydroécologie Appliquée 16, 169-189.

- Vaquer-Sunyer, R.; Duarte C.M., 2011: Temperature effects on oxygen thresholds for hypoxia in marine benthic organisms. *Global Change Biology* 17, 1788-1797.
- Williot, P.; Chèvre P., 2011: Chapter 32 Reproduction of the cultured brood fish, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon *Acipenser sturio* L.*, 1758, Springer, pp. 439-448.
- Williot, P.; Castelnaud G., 2011: Chapter 20 Historic overview of the European sturgeon *Acipenser sturio* in France: surveys, regulations, reasons for the decline, conservation, and analysis, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon *Acipenser sturio* L.*, 1758, Springer, pp. 285-308.
- Williot, P.; Rouault T.; Brun R.; Pelard M.; Mercier D., 2002: Status of caught wild spawners and propagation of the endangered sturgeon *Acipenser sturio* in France: a synthesis. *International Review of Hydrobiology* 87, 515-524.
- Williot, P.; Rochard E.; Desse-Berset N.; Gessner J.; Kirschbaum F., 2011a: Chapter 1 Brief introduction to sturgeon with a special focus on the European sturgeon, *Acipenser sturio* L. 1758, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon *Acipenser sturio* L.*, 1758, Springer, pp. 3-12.
- Williot, P.; Rouault T.; Brun J.R.; Pelard M.; Mercier D.; Jacobs L.; Kirschbaum F., 2011b: Chapter 31 Building a brood stock of *Acipenser sturio* in France, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon *Acipenser sturio* L.*, 1758, Springer, pp. 425-438.
- Zhang, Y.; Kieffer J.D., 2014: Critical thermal maximum (CTmax) and hematology of shortnose sturgeons (*Acipenser brevirostrum*) acclimated to three temperatures. *Canadian Journal of Zoology* 92, 215-221.
- Ziegeweid, J.R.; Jennings C.A.; Peterson D.L., 2008: Thermal maxima for juvenile shortnose sturgeon acclimated to different temperatures. *Environmental Biology of Fishes* 82, 299-307.

II. Synthèse des résultats et lien avec le chapitre n°4

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent une sensibilité des embryons et des larves d'esturgeon européen aux conditions oxythermiques bien plus forte que celle des juvéniles de trois mois. En terme de tolérance à la température, on observe une forte chute de la survie embryonnaire lors du passage de 20 à 26°C. En conditions de normoxie, les juvéniles ne semblent pas impactés par le passage de 20 à 25°C. Concernant la tolérance à l'oxygène, nous avons pu observer qu'une hypoxie d'intensité moyenne (50 % O₂ sat) provoque des effets drastiques sur le stade embryo-larvaire en empêchant l'éclosion. Chez les juvéniles, les premiers effets de l'hypoxie se traduisent par l'atération de la nage autour de 35 et 44 % O₂ sat à 20 et 25 °C respectivement. La mort de l'individu n'intervient que pour des niveaux d'oxygène inférieurs à 15 % O₂ sat. Une diminution de la tolérance à l'hypoxie lors de l'augmentation de la température est observée chez les juvéniles. Le niveau de saturation en oxygène pour lequel on note l'apparition de l'altération de la nage est légèrement plus haut à 25 °C qu'à 20 °C.

Le bouchon vaseux ne représente pas, en l'état, un danger pour la survie de l'espèce dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne. D'après les résultats de cette étude, la traversée du bouchon vaseux par les juvéniles d'esturgeon européen semble réalisable sans impacter la survie des individus. Sur la base des résultats obtenus dans les chapitre 2 et 3 de ce travail de thèse, les conditions oxythermiques actuelles ne représentent pas un frein au retour de l'esturgeon européen dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne.

L'impact des polluants a régulièrement été avancé pour expliquer partiellement la diminution des effectifs d'esturgeon européen dans les différents bassin versants (Williot et al., 1997; Bronzi et al., 2011; Gessner et al., 2011). L'un des lieux de stockage à long terme des polluants, notamment les polluants hydrophobes, est le compartiment sédimentaire. Or, les embryons d'esturgeon européens, une fois fécondés, se collaient et se développaient au contact de l'ensemble des supports disponibles. Ainsi, une partie des embryons se développaient au contact direct du sédiment. On peut donc raisonnablement se poser la question de savoir si la qualité actuelle des sédiments de frayères permet d'accueillir à nouveau une reproduction et le développement de jeunes stades d'esturgeons européens.

CHAPITRE 4 : LE TEST EMBRYO-LARVAIRE
MEDAKA PEUT-IL REMPLACER LE TEST EMBRYO-
LARVAIRE ESTURGEON DANS L'EVALUATION DE
LA QUALITE DES FRAYERES

I. Préambule

La législation concernant l'utilisation de l'esturgeon européen pour des études scientifiques est particulièrement stricte. De nombreux textes réglementaires encadrent l'utilisation de cette espèce (Rochard, 2011). S'agissant d'une espèce en danger critique d'extinction (IUCN, 2006), et malgré le fait que l'utilisation des stades embryonnaires et pro-larvaires n'est pas soumise à l'appréciation d'un comité d'éthique, il est nécessaire de limiter le nombre d'expérimentations et le nombre d'individus à son strict minimum. Ainsi, l'utilisation d'un poisson modèle de type médaka japonais est une alternative séduisante et ce pour de nombreuses raisons.

Le médaka japonais *Oryzias latipes* est communément employé au cours de tests (medaka embryo-larval assay ou MELAc) pour l'évaluation de la toxicité de sédiments (Cachot et al., 2007), de mélanges de polluants (Le Bihanic et al., 2014b) ou d'eaux de rejets. Contrairement à l'esturgeon européen, son coût d'élevage est faible. En effet, les géniteurs de medaka japonais (LT \approx 4 cm) peuvent être maintenus dans un petit aquarium contre un bâtiment entier pour l'esturgeon européen (LT \approx 2 m). Le développement embryonnaire du médaka japonais est clairement décrit (Iwamatsu, 2004) alors que la description de celui de l'esturgeon européen n'est connu que chez des espèces proches (Detlaf et al., 1981). L'observation des malformations, indicateurs précoce de toxicité, est facilitée chez le médaka japonais par un chorion transparent et une larve faiblement pigmentée (Padilla et al., 2009).

Si l'utilisation du test MELAc présente de nombreux avantages par rapport à l'utilisation de tests embryo-larvaires sur l'esturgeon européen, il est tout de même nécessaire de valider ce test alternatif par la comparaison des effets de conditions identiques sur les deux espèces. Ainsi, les effets potentiels des sédiments issus de quatre des 28 frayères historiques de l'esturgeon européen (Jego et al., 2002) ont été testés sur les deux espèces. Afin d'obtenir des résultats contrastés entre les différentes conditions d'exposition, les quatre sites ont été sélectionnés dans des secteurs géographiques éloignés les uns des autres et pour lesquels l'utilisation des sols est différente.

Article n°3 : How sensitive are European sturgeon and Japanese medaka embryos to substratum quality from sturgeon spawning ground ?

Delage N.^{1,2}, Morin B.², Landi L.², Gesset C.¹, Le Barh R.¹, Clérandeau C.², Jatteau P.¹, Rochard E.¹, Cachot J.²

¹ IRSTEA EABX, Aquatic Ecosystems and Global Changes research unit, 50 avenue de Verdun 33612 Cestas France

² University of Bordeaux, UMR CNRS EPOC 5805, avenue des Facultés, 33405 Talence cedex, France

ABSTRACT

European sturgeon is an endangered anadromous fish species which embryonic development takes place in contact of river substratum. The only remaining population occupy Garonne and Dordogne river. Because of the difficulty to obtain European sturgeon embryos and its highly protected status, Medaka embryo larval assay (MELAc test) have been considered as an alternative. Toxicological effects from four European sturgeon's spawning grounds sediments were evaluated using both species. The goals of this study were to assess site toxicity and the possibility to substitute MELAc test to European sturgeon embryo assay. Tests on both species were performed using the same acute and subacute endpoints (survival, hatching success, malformation spectra, behaviour and comet assay). European sturgeon's embryo-larval exposure was performed in specially made devices. Similar sediments collection were used in both species. Each criteria exhibit a similar response shape between European sturgeon and Japanese medaka. No acute effects due to sediment origin exposure were observed in both species. Results obtained in this study allow to conclude in the feasibility of using medaka embryo-larval assay as a good alternative to tests on European sturgeon. Survival rate and hatching success were higher in Japanese medaka than in European sturgeon because of different reproductive strategies. Generally speaking Garonne river sediment seems to induce higher toxic effects than Dordogne river sediment. An upstream-downstream effect appeared using Dordogne sediment and was largely more obvious in Japanese medaka than in European sturgeon. As this study was performed using only four sites were used, better evaluation of river sediment quality should be obtained using more sites.

INTRODUCTION

European sturgeon is an anadromous fish species historically represented in all large European catchments. Its populations decreased dramatically during the 20th century because of human activities (Lepage et al., 2000b; Williot et al., 2002) with only a single wild population remaining in the Gironde Garonne Dordogne (GGD) basin (Williot and Castelnaud, 2011; Williot et al., 2011b). An ambitious restoration program, initiated in the late 1970s by the research institute IRSTEA, was launched with stocking operations managed in the GGD basin (Williot and Castelnaud, 2011). To date more than 1.6 million early life stage (ELS) have been released since 1995 (Acolas et al., 2012). According to their life cycle young fishes released in 1995 are expected to come back in the basin to breed in the next few years. Thus new interrogations rise up such as the capacity of ELS to face current physico-chemical conditions in the basin (Delage et al., 2014) and especially the putative toxicity of sediments from spawning ground.

Reproduction takes place in freshwater where larvae and early juveniles remain up to a few months and then migrate downstream to settle in estuary until four years old. Then they grow mainly in the coastal marine areas and come back in fresh water only for reproduction. European sturgeons are sexually mature at 10-12 years old for male and 14-16 years old for female. Reproduction can occur every two to four years during their whole lifespan (Acolas et al., 2011). Eggs are emitted in the water column and stick on plants, rocks and pebbles on the river bed. Its reproduction and early life stage (ELS) development take place in very specific breeding areas. Such places are 5 m deep zone characterized by a water flux speed between 0.1 and 1 m.s⁻¹ and with a substratum mainly composed of pebbles from 20 to 100 mm diameter. An area located downstream from a dam can also be considered as a putatively suitable spawning area (Jego et al., 2002). These authors identified 28 places potentially considered as spawning grounds in the Gironde-Garonne-Dordogne catchment. Fifteen were identified in Garonne river and 13 in Dordogne river.

Indeed sediment compartment is the final sink for many hydrophobic and metallic pollutants and behaves as a secondary source of contamination for water column and trophic web (Mouchet et al., 2006; Motelay-Massei et al., 2007).

In order to deal with constraints induced by working on European sturgeon, the medaka embryo larval assay (MELAc) represents an interesting opportunity to get a large overview of substrate quality in the GGD basin (González-Doncel et al., 2003; Farwell et al., 2006; González-Doncel et al., 2008). Indeed, using Japanese medaka ELS is of large interest in many point of

view. Contrary to European sturgeon, Japanese medaka embryos present some useful advantages for developmental toxicity testing. They present a transparent chorion, embryos are not pigmented facilitating observation. Japanese medaka ELS development is well described, embryos have a small size, present a low maintenance cost (Wittbrodt et al., 2002) and genitors can spawn all over the year (Iwamatsu, 2004). Furthermore, the MELAc test enables to study complex matrices containing a mixture of chemicals with different toxicity and bioavailability.

The goals of the present study were (i) to evaluate substratum quality of European sturgeon's spawning ground using a new embryo-larval assay with *A. sturio* and (ii) to perform a comparison of toxicity results with those obtained with Medaka embryo-larval assay. Embryos from both species were incubated at the surface of sediment samples from four spawning grounds during their whole development and in optimal conditions. Developmental effects were then recorded at the embryonic and larval stages and intensity of effects were compared between the two species. In this study, some keys endpoints according to sediment quality such as embryonic survival, hatching success, growth retardation and developmental abnormalities were evaluated. In addition to these putative lethal and teratogenic effects of sediments exposure (Vicquelin et al., 2011; Barjhoux et al., 2012; Le Bihanic et al., 2014c), genotoxicity can be evaluated using the comet assay (Kammann et al., 2004; Kumaravel et al., 2009; Morin et al., 2011). As behaviour and especially swimming performance is altered by pollutant (Le Bihanic et al., 2015), this parameter has also been tested in this study. As European sturgeon and Japanese medaka use two different reproduction strategies, comparison in response of the two species were based on the response shape and not the absolute data.

MATERIALS AND METHODS

Substratum selection and sampling

European sturgeon breeding area include the Garonne river with 15 putative spawning grounds and the Dordogne river with 13 putative spawning grounds (Jego et al., 2002). Spawning ground repartition is limited upstream by the Bergerac dam in the Dordogne river (211 km far away from the sea) and the Beauregard step in the Garonne river (270 km far away from the sea).

In order to obtain contrasted results two sites from both rivers were selected (Figure 37, page 116). On each river, the most downstream (i.e. La Réole for Garonne river and Pessac-sur-Dordogne for Dordogne river) and the most upstream (i.e. Beauregard for Garonne river and

day, pH was measured in each replicate at the beginning and the end of the exposure around 12 days post fecundation and 15 days for Japanese medaka and European sturgeon respectively. Each day, the nitex grid was removed and embryos were examined under a stereo-microscope. Dead individuals were recorded and removed to prevent bacterial contamination. Hatching in each replicate was recorded and larvae were measured and pictured to evaluate frequency and importance of malformation (Vicquelin et al., 2011).

Embryo-larval assay with European Sturgeon

Embryos and larvae were exposed using the built system for European Sturgeon described in Delage et al. (2014). Two parental origins were used. After fertilisation (Delage et al., 2014), about 200 embryos per replicate were set on a steel grid. Sediments were placed under this grid and water flux had to pass through the sediments before bathing embryos. Embryos and larvae were left in this device until first feed (about 13 dpf). Tests performed on European sturgeon were based on the MELAc test experimental design. Dead individuals were removed every day to prevent bacterial contamination and to evaluate mortality. Hatching events were counted every two hours after the first hatching. At 2 dph, larvae were measured and pictured to evaluate malformation. During incubation, temperature and oxygen saturation were controlled and stabilized at 20°C and 90% O₂ sat, conditions considered as the optimum for embryonic development in European sturgeon. The same measurements and protocol used in MELAc tests were performed with *A. sturio*.

Behaviour assay

Larval swimming behaviour was evaluated using Ethovision 9 software (Noldus). Two dph larvae were individually placed in Petri dishes of 10 cm diameter for European sturgeon and in a 48-well plate for Japanese medaka filled with rearing water. An infrared camera was placed above this system. The room light was switched off one hour before the beginning of the test to allow larvae acclimation. Video recording lasted 20 minutes in darkness and mean speed was measured each 30 seconds. As European sturgeon did not react to any stress, Japanese medaka test (Le Bihanic et al., 2015) was adapted to be consistent between both species.

Comet assay

According to the protocol described in Morin et al (2011) and completed by Barjhoux et al (2012), five 3 days old Japanese medaka larvae per replicate were killed to perform the comet assay. European sturgeon blood was collected from three individuals per replicate at total yolk sac resorption stage. Cell viability was measured by trypan blue exclusion and comet assay experiments were only carried out with samples of >80% cell viability. Ethidium bromide (20µg/L) was used as DNA fluorescent tag and all coded-slides were randomly analyzed for 100 nuclei per gel (two gel per replicate) using an Olympus epifluorescent microscope (200X magnification) equipped with CCD camera (Zeiss, DE) and Comet Assay IV software (Perspective Instruments, UK). The percentage of DNA which migrate from the nucleus (% tail DNA) was used as criterion for DNA damage measurement. Heavily damaged cells exhibiting a specific microscopic image (commonly referred to as hedgehogs or ghost cells) consisting of small or non-existent head and large and diffuse tail were scored for 100 counted comet cells.

Statistics

Statistical analysis was performed using R software. Replicated conditions were considered as independent experiments. Data normality was checked using the Shapiro-Wilk test and equality of variance was verified using the Bartlett test. In the case of a normal distribution of data and equality of variance, One-Way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by a Tukey post hoc test. When one of these criteria was not respected, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed.

RESULTS

No significant differences were revealed between parental origins in *A. sturio* for any criterion ($p > 0.05$). Thus, no distinction have been done between parental origins.

Lethal effects

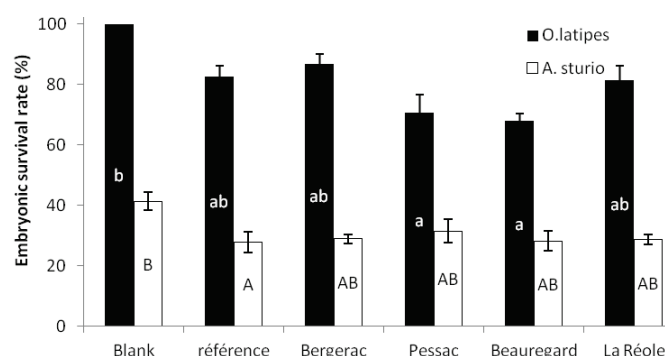


Figure 38: Embryonic survival rate (mean \pm SE) in Japanese medaka (left bars) and European sturgeon (right bars) according to exposition to river sediment from different locations. Minuscul letters indicates statistical differences between condition in Japanese medaka and capitals letters are used for differences in European sturgeon (Anova, N=3, $p < 0.05$).

Anova performed on Japanese medaka tests (Pvalue = 0.0174) and European sturgeon tests (Pvalue = 0.0381) showed a statistical difference between sediments tested (Figure 38, page 119). In both species the higher embryonic survival rate was observed for blank condition. No significant difference appeared between conditions exposed to sediments, whatever the considered sediments in both species.

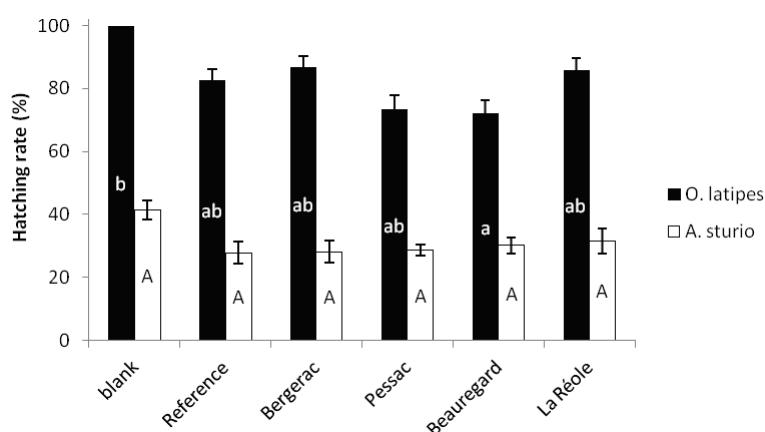


Figure 39: Hatching rate (mean \pm SE, absolute percentages) in Japanese medaka (left bars) and European sturgeon (right bars) according to exposition to river sediments from different locations. Minuscul letters indicates statistical differences between condition in Japanese medaka and capitals letters are used for differences in European sturgeon (Anova, N=3, $p < 0.05$).

According to hatching success criterion (Figure 39, page 119), Anova test showed differences in Japanese medaka only (Pvalue = 0.027). As in embryonic survival, the higher

hatching rate was observed in blank condition and no significant difference was observed between all sediments tested. Even if there is no significant differences revealed by the Anova on European sturgeon (Pvalue = 0.0743) a close pattern as in Japan medaka can be observed.

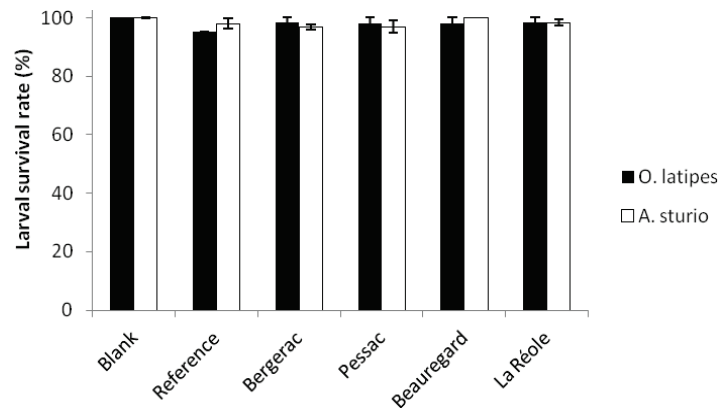


Figure 40: Larval survival rate (mean \pm SE) in Japanese medaka (left bars) and European sturgeon (right bars) according to exposition to river sediments from different locations. No statistical differences were observed between conditions (Anova, N=3, $p < 0.05$)

Larval survival rate (Figure 40, page 120) was not significantly different between conditions tested in both species (A. sturio: Pvalue = 0.346 ; O. latipes: Pvalue = 0.561). In both species, mortality at larval stage was close to zero.

Sublethal effects

Anova tests performed for deformed larvae in European sturgeon (Pvalue = 0.039) and Japanese medaka (Pvalue = 0.0005) showed toxicity differences between sediment samples from both species (Table 7). In both case the lowest malformation rate is observed for blank condition and the highest for La Réole sediment. The same pattern is observed between the response of those two species except for Reference and Bergerac sediments. Response variability of European sturgeon is higher than in Japanese medaka. Malformation criteria analysed separately showed significant difference only in Oedema proportion in Japanese medaka (Pvalue = 0.003) but no other (Pvalue > 0.05).

Table 7: Developmental deformities observed in larvae at hatching according to exposure conditions and species. Data are expressed in proportion of impaired larvae (mean \pm SE; N = 3).

| | Deformed larvae | Oedemata | Spinal deformities | Craniofacial malformations | Eye abnormalities | Cardiovascular anomalies |
|------------------------|-----------------|----------|--------------------|----------------------------|-------------------|--------------------------|
| <i>Oryzias latipes</i> | | | | | | |

Chapitre 4 : Le test embryo-larvaire médaka peut-il remplacer le test embryo-larvaire esturgeon dans l'évaluation de la qualité des frayères

| | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------|---------------|------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Blank | 13,3 ± 0,0 | ^a | 6,7 ± 0,0 | ^{ab} | 6,7 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| Reference | 22,2 ± 2,2 | ^a | 6,7 ± 3,8 | ^a | 6,7 ± 3,8 | 2,2 ± 2,2 | 2,2 ± 2,2 | 4,4 ± 4,4 |
| Bergerac | 44,4 ± 4,4 | ^b | 22,2 ± 2,2 | ^{ac} | 15,6 ± 8,0 | 4,4 ± 4,4 | 2,2 ± 2,2 | 4,4 ± 2,2 |
| Pessac | 48,9 ± 2,2 | ^b | 28,9 ± 4,4 | ^{bc} | 11,1 ± 4,4 | 8,9 ± 4,4 | 2,2 ± 2,2 | 2,2 ± 2,2 |
| Beauregard | 44,4 ± 4,4 | ^b | 26,7 ± 3,8 | ^{bc} | 15,6 ± 2,2 | 6,7 ± 0,0 | 4,4 ± 4,4 | 2,2 ± 2,2 |
| La Réole | 55,2 ± 4,8 | ^b | 33,5 ± 3,7 | ^c | 26,1 ± 4,4 | 4,4 ± 4,4 | 5,3 ± 2,7 | 4,4 ± 4,4 |
| <i>Acipenser sturio</i> | | | | | | | | |
| Blank | 20,2 ± 7,1 | ^a | 3,7 ± 3,7 | | 7,4 ± 7,4 | 10,4 ± 0,0 | 7,4 ± 0,0 | 13,5 ± 0,0 |
| Reference | 38,1 ± 4,3 | ^{ab} | 7,4 ± 7,4 | | 10,7 ± 6,4 | 24,1 ± 8,7 | 10,7 ± 6,4 | 17,8 ± 9,7 |
| Bergerac | 22,4 ± 2,4 | ^a | 3,0 ± 3,0 | | 3,0 ± 3,0 | 15,8 ± 5,8 | 3,0 ± 3,0 | 6,7 ± 3,3 |
| Pessac | 44,5 ± 10,0 | ^{ab} | 3,0 ± 3,0 | | 15,2 ± 15,2 | 25,2 ± 13,3 | 3,0 ± 3,0 | 23,0 ± 7,0 |
| Beauregard | 37,4 ± 6,2 | ^{ab} | 0,0 ± 0,0 | | 16,9 ± 8,7 | 18,0 ± 12,8 | 8,5 ± 4,3 | 20,5 ± 3,2 |
| La Réole | 68,8 ± 18,4 | ^b | 0,0 ± 0,0 | | 23,0 ± 13,5 | 35,8 ± 7,2 | 26,4 ± 12,2 | 33,0 ± 12,3 |

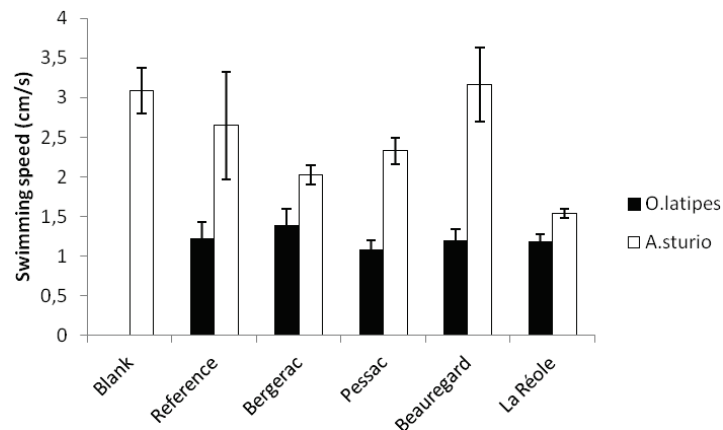


Figure 41: Swimming speed during resting (mean ± SE) in Japanese medaka (left bars) and European sturgeon (right bars) according to exposition to river sediments from different locations. No significant difference was observed in both Japanese medaka and European sturgeon (ANOVA, N=3, p>0.05)

Too low detection rate in the Blank condition in *O. latipes* did not allow to perform analysis with this condition. No significant difference was observed in Japanese medaka (ANOVA, Pvalue = 0.77) and European sturgeon (Pvalue = 0.15) swimming speed (Figure 41, page 121) between conditions tested even if a large decrease in swimming speed appeared in La Réole substrate condition for *A. sturio* (for which N= 2). It is interesting to notice that there is a low variability between and within tested conditions in Japanese medaka compared to European sturgeon.

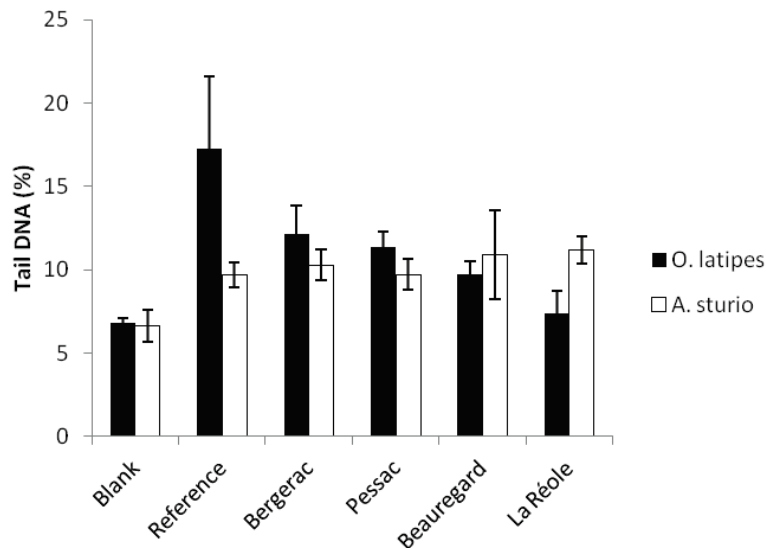


Figure 42: DNA strand breaks (mean \pm SE) in Japanese medaka (left bars) and European sturgeon (right bars) exposed to river sediments from different location. Minuscule letters express statistical differences between condition in Japanese medaka and capitals letters are used for differences in European sturgeon.

DNA damage (expressed as % tail DNA) in the blank condition is low and the response variability between replicate is low for both species. No significant difference between treatments in European sturgeon blood was observed using Anova test (Pvalue = 0.0931) (Figure 42, page 122). Interestingly in Japanese medaka, even if Anova test does not reveal significant difference (Pvalue = 0.0583), a tukey pairwise comparison shows a significant higher value of DNA strand breaks for Reference sediment compare to La Réole treatment (Pvalue = 0.0406). In European sturgeon blood and Japanese medaka whole organism, anova revealed significant differences in proportion of apoptotic cells (Pvalue = $1.67 \cdot 10^{-7}$ and $1.25 \cdot 10^{-6}$ respectively). For *A. sturio*, Bergerac, Beauregard and La Réole exposure conditions induced higher percent of apoptotic cells compared to the Blank and Reference conditions. For *O. latipes*, Pessac, Beauregard and La Réole exposure conditions induced significant increase in proportion of apoptotic cells compare to Blank condition only. In both *O. latipes* and *A. sturio*, the lowest hedgehog proportion is observed for blank condition and the highest induction of apoptotic cells for La Réole sediment (Figure 43, page 123).

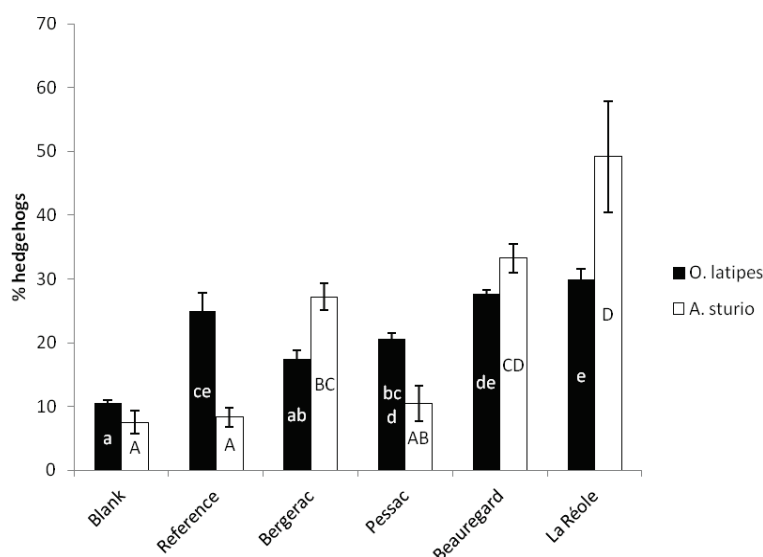


Figure 43: Proportion of apoptotic cells (mean \pm SE) in Japanese medaka (left bars) and European sturgeon (right bars) according to exposition to river sediments from different locations. Minuscule letters express statistical differences between condition in Japanese medaka and capitals letters are used for differences in European sturgeon (Anova, N=3, $p < 0.05$)

DISCUSSION

*Quality of spawning ground for *A. sturio* embryonic development*

Comparing to previous studies using the same protocol, embryonic survival and hatching rate in *A. sturio*, appeared to be lower in this study (Delage et al., 2014; Delage et al., submitted). Such a decrease should be due to bad maturation status of genitors used in this study. European sturgeon embryo larval assay allows to discriminate some effects according to exposure conditions (Table 8). Thus, high toxic effects is observed mainly in La Réole substrate condition. Among the substrate conditions tested, Bergerac seems to induce the lowest effects. As expected an upstream-downstream gradient seems to appear in both Dordogne and Garonne rivers and toxicological effect are higher in Garonne river than Dordogne river. According to these conclusions, upstream sites of Dordogne river are more suitable to receive a successful European sturgeon's breeding than others. At the opposite, downstream sites from Garonne river are less suitable for this species than others.

In four of the seven criteria tested, no toxic effects can be observed using sturgeon. Only the embryonic survival, deformed larvae proportion and apoptotic cells proportion permit

discrimination according to conditions and controls. In two of these three criteria, reference condition induce higher toxic effects than blank condition.

Table 8: Evaluation of toxicological effects in European sturgeon, compared to Blank condition, according to exposure condition and criterion tested. No effect is expressed using -, low and high toxic effect is expressed by + and ++.

| | | Embryonic survival | Larval survival | Hatching success | Malformation rate | Swimming speed | Tail DNA | Hedgehog |
|----------------|------------|--------------------|-----------------|------------------|-------------------|----------------|----------|----------|
| Control | Blank | - | - | - | - | - | - | - |
| | Reference | + | - | - | + | - | - | - |
| Dordogne river | Bergerac | + | - | - | - | - | - | + |
| | Pessac | + | - | - | + | - | - | - |
| Garonne river | Beauregard | + | - | - | + | - | - | + |
| | La Réole | + | - | - | ++ | - | - | ++ |

MELAc as an alternative to measure quality of sturgeon spawning ground

MELA's results show similarities with European sturgeon's assay in term of response shape. It is interesting to notice that toxic effects are expressed by the exposure to Reference substratum. Four of the seven criteria tested express toxic effects in Japanese medaka (Table 9), embryonic survival, hatching success, malformation rate and apoptotic cells proportion. Among these four criteria, all natural substrate expressed toxicological effects. According to the embryonic survival, an upstream-downstream effect appears in Dordogne river but not in Garonne river. According to embryonic survival, hatching success and hedgehog proportion, Garonne river induce higher toxicological effects than Dordogne river.

Table 9: Evaluation of toxicological effects in Japanese medaka, compared to Blank condition, according to exposure condition and criterion tested. No effect is expressed using -, low and high toxic effect is expressed by + and ++.

| | | Embryonic survival | Larval survival | Hatching success | Malformation rate | Swimming speed | Tail DNA | Hedgehog |
|----------------|------------|--------------------|-----------------|------------------|-------------------|----------------|----------|----------|
| Control | Blank | - | - | - | - | - | - | - |
| | Reference | + | - | + | - | - | - | ++ |
| Dordogne river | Bergerac | + | - | + | + | - | - | - |
| | Pessac | ++ | - | + | + | - | - | + |
| Garonne river | Beauregard | ++ | - | ++ | + | - | - | ++ |
| | La Réole | + | - | + | + | - | - | ++ |

The reference substratum was composed only with silicate and so was not expected to induce deleterious effects (Le Bihanic et al., 2014a). Interestingly, acute and subacute effects were observed in both species when exposed to this condition. It appears that silicate induce deleterious effects and cannot then be considered as a reference substratum strictly speaking. Thus, the use of another Reference substratum as control should be feasible in further study.

Similarity between *A. sturio* and *O. latipes* responses

Considering both embryonic and larval survival, *A. sturio* and *O. latipes*, response shape were close from each other. Moreover, a similar shape of response is observed in both species with the highest survival rate for no substratum exposure. The difference between exposure conditions is very low and not significant. It can be conclude that the decrease in survival between blank condition and all others is due to the presence of substratum itself independently from substratum content. At embryonic stages both species breath by oxygen diffusion across the chorion (Czerkies et al., 2002). Particle matter stuck at the surface of the chorion and may decrease the available area in contact with water and thus the oxygen availability to the embryo. Hatching results show the same pattern. During hatching, energy expenditure increase (Ninness et al., 2006) and thus the oxygen consumption increase. Oxygen is provided to eggs through diffusion, when the diffusion area decrease, the oxygen is limited. Because oxygen availability to embryos is lower in individuals exposed to sediment conditions than in blank, the hatching success decrease in these conditions. The hatching effect hide the sediment quality effect.

In larvae, contrary to embryos, survival in both species was very high and no difference between conditions were observed. It could be explained by the fact that the selection pressure during embryonic stage and hatching event select only the most resistant individuals but also by the fact that the sensitivity to any pressure decrease with increasing age (Ishibashi et al., 2005; Delage et al., 2014). Furthermore, as larvae from those two species are free living individuals breathing by gills, they are not limited by the presence of substratum itself but only by the substratum content.

In embryo-larval assay, morphological abnormalities are currently used (Nagel, 2001; Lammer et al., 2009). The highest similarities between Japanese medaka and European sturgeon responses to conditions tested are observed on malformation rate. The response pattern is almost

exactly the same in both species except for Bergerac and the Reference conditions. A higher variability in individual responses within condition is observed for European sturgeon compared to Japanese medaka.

Comet assay showed similarities between Japanese medaka whole body and European sturgeon blood cells. It can be noticed that the lowest DNA damage in both species was observable in the Blank condition. Percentage of tail DNA indicate the level of DNA strand breaks an individual has undergone (Kumaravel et al., 2009). Concerning hedgehog proportion, the response shape is the same between species. The lowest response is obtained for the blank condition and the highest for La Réole condition. It must be taken in account that hedgehogs are not clearly defined and might represent the very earliest stages of DNA breakdown in apoptosis but those comets might also frequently represent the upper end of a continuum of damage that can be assessed as genotoxic damage as previously described (Kumaravel et al., 2009; Lorenzo et al., 2013).

Differences between *A. sturio* and *O. latipes* responses

High differences appears between Japanese medaka and European sturgeon embryos in term of survival rate which should be due to the reproduction strategies in these two species. Japanese medaka produces a low number of embryos with high survival potential (Nimrod and Benson, 1998; González-Doncel et al., 2003) unlike European sturgeon which produces a large number of embryos with a low survival potential (Williot and Chèvre, 2011; Williot et al., 2011a). For each criterion measured, the variability within condition was higher in *A. sturio* than in *O. latipes*. Concerning hatching, results showed significant differences between conditions in Japanese medaka but not in European sturgeon.

Results obtained in Japanese medaka tests are, in most of cases, more contrasted than results obtained in European sturgeon, except for malformation and behavioural endpoint. It suggests that Japanese medaka is more sensitive than European sturgeon. But the high variability should have been of high importance in the low difference between conditions for *A. sturio*.

Hedgehog proportion show significant differences between European sturgeon blood cells and whole Japanese medaka larvae cells. In this case, like in malformation criterion, the only differences in the response shape between those two species is observed for Bergerac condition and the reference condition. Bergerac site is known to be the less putatively contaminated site among the four sites selected.

In this study, malformation rate has been used as a global evaluation of all malformations recorded in each individual. But the type and the proportion of each malformation type are highly different from one species to the other. In the perspective of using malformation criterion in MELAc instead of tests on European sturgeons, it is necessary to focus on the global evaluation and not on a particular type.

Larval behaviour has been measured in this study using the swimming speed without stress because no one of the tested stressors had a significant impact on *A. sturio*'s behaviour. The responses obtained were very different between species, highly variable between individuals and not significant between conditions. In this point of view, the use of behavioural test, in order to replace test on European sturgeon by MELA, is not relevant.

CONCLUSION

Results obtained in this study allow to conclude in the feasibility of using medaka embryo-larval assay as a good alternative to tests on European sturgeon and many other target species. Little differences have been found between the two species and have to be taken in account in order to conclude in European sturgeon's spawning ground quality using MELAc test. Generally speaking Garonne river sediment seems to induce higher toxic effects than Dordogne river sediment. The upstream-downstream effect is largely more obvious in Japanese medaka than in European sturgeon.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is financially supported by the following bodies: Région Aquitaine, ANR (ANR CESA (Sturtop project, ANR-13-CESA-0018-01)).

LITERATURE CITED

- Acolas M.L., Castelnaud G., Lepage M., Rochard E. (2011) Chapter 10 Biological cycle and migrations, in: P. Williot, et al. (Eds.), Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 147-152.
- Acolas M.L., Rouleau E., Le barh R., Bigot J.F., ballion B., Gesset C., E. R. (2012) Suivi de la population d'esturgeons européens., in: M. L. Acolas (Ed.), Programme de recherche et de

- conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio*; bilan scientifique et technique 2011. , Irstea, Bordeaux. pp. 24-32.
- Barjhoux I., Baudrimont M., Morin B., Landi L., Gonzalez P., Cachot J. (2012) Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79:272-82.
- Czerkies P., Kordalski K., Golas T., Kryszinski D., Luczynski M. (2002) Oxygen requirements of whitefish and vendace (*Coregoninae*) embryos at final stages of their development. *Aquaculture* 211:375-385.
- Delage N., Cachot J., Rochard E., Fraty R., Jatteau P. (2014) Hypoxia tolerance of European sturgeon (*Acipenser sturio* L., 1758) young stages at two temperatures. *Journal of Applied Ichthyology*:n/a-n/a. DOI: 10.1111/jai.12609.
- Delage N., Couturier B., Jatteau P., Larcher T., Ledevin M., Goubin H., Cachot J., Rochard E. (submitted) Oxythermal window drastically constraints the survival and development of European sturgeon early life stages. *Journal of Fish Biology* in press.
- Farwell A., Nero V., Croft M., Bal P., Dixon D.G. (2006) Modified Japanese medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51:600-607.
- González-Doncel M., De La Peña E., Barrueco C., Hinton D.E. (2003) Stage sensitivity of medaka (*Oryzias latipes*) eggs and embryos to permethrin. *Aquatic Toxicology* 62:255-268.
- González-Doncel M., González L., Fernández-Torija C., Navas J.M., Tarazona J.V. (2008) Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 87:280-288.
- Ishibashi Y., Inoue K., Nakatsukasa H., Ishitani Y., Miyashita S., Murata O. (2005) Ontogeny of tolerance to hypoxia and oxygen consumption of larval and juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 244:331-340.
- Iwamatsu T. (2004) Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of development* 121:605-618.
- Jego S., Gazeau C., Jatteau P., Elie P., Rochard E. (2002) Spawning grounds available for the European sturgeon *Acipenser sturio* L. 1758 in the Garonne-Dordogne Basin. Methods used, present status and prospects. Les frayères potentielles de l'esturgeon Européen *Acipenser sturio* L. 1758 dans le Bassin Garonne-Dordogne. Méthodes d'investigation, état actuel et perspectives:487-505.

- Kammann U., Biselli S., Hühnerfuss H., Reineke N., Theobald N., Vobach M., Wosniok W. (2004) Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environmental Pollution* 132:279-287.
- Kumaravel T., Vilhar B., Faux S., Jha A. (2009) Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25:53-64. DOI: 10.1007/s10565-007-9043-9.
- Lammer E., Carr G.J., Wendler K., Rawlings J.M., Belanger S.E., Braunbeck T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 149:13.
- Le Bihanic F., Morin B., Cousin X., Le Menach K., Budzinski H., Cachot J. (2014a) Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout. *Environmental Science and Pollution Research* 21:13720-13731.
- Le Bihanic F., Perrichon P., Landi L., Clérandeau C., Le Menach K., Budzinski H., Cousin X., Cachot J. (2014b) Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. *Environmental Science and Pollution Research*:1-14.
- Le Bihanic F., Sommard V., Perrine D.L., Pichon A., Grasset J., Berrada S., Budzinski H., Cousin X., Morin B., Cachot J. (2015) Environmental concentrations of benz[a]anthracene induce developmental defects and DNA damage and impair photomotor response in Japanese medaka larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113:321-328.
- Lepage M., Rochard E., Castelnaud G. (2000) Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 restoration and gravel extraction in the Gironde estuary. *Boletin - Instituto Espanol de Oceanografia* 16:175-179.
- Lorenzo Y., Costa S., Collins A.R., Azqueta A. (2013) The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*:get018.
- Morin B., Filatreau J., Vicquelin L., Barjhoux I., Guinel S., Leray-Forget J., Cachot J. (2011) Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399:2235-2242.
- Motelay-Massei A., Ollivon D., Garban B., Tiphagne-Larcher K., Chevreuil M. (2007) Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Seine estuary, France: Mass balance and role of atmospheric deposition. *Hydrobiologia* 588:145-157.

- Mouchet F., Gauthier L., Mailhes C., Jourdain M.J., Ferrier V., Triffault G., Devaux A. (2006) Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox® and Ames tests). *Science of the Total Environment* 355:232-246.
- Nagel R. (2001) DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19:38-48.
- Nimrod A.C., Benson W.H. (1998) Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens. *Aquatic Toxicology* 44:141-156.
- Ninness M.M., Stevens E.D., Wright P.A. (2006) Energy expenditure during hatching in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63:1405-1413. DOI: doi:10.1139/f06-036.
- Vicquelin L., Leray-Forget J., Peluhet L., LeMenach K., Deflandre B., Anschutz P., Etcheber H., Morin B., Budzinski H., Cachot J. (2011) A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquatic Toxicology* 105:235-245. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.06.011.
- Williot P., Castelnaud G. (2011) Chapter 20 Historic overview of the European sturgeon *Acipenser sturio* in France: surveys, regulations, reasons for the decline, conservation, and analysis, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 285-308.
- Williot P., Chèvre P. (2011) Chapter 32 Reproduction of the cultured brood fish, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 439-448.
- Williot P., Rouault T., Brun R., Gessner J. (2011a) Chapter 12 Characteristics of the reproductive cycle of wild *Acipenser sturio*, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 165-175.
- Williot P., Rouault T., Brun R., Pelard M., Mercier D. (2002) Status of caught wild spawners and propagation of the endangered sturgeon *Acipenser sturio* in France: a synthesis. *International Review of Hydrobiology* 87:515-524.
- Williot P., Rochard E., Desse-Berset N., Gessner J., Kirschbaum F. (2011b) Chapter 1 Brief introduction to sturgeon with a special focus on the European sturgeon, *Acipenser sturio* L.

1758, in: P. Williot, et al. (Eds.), Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 3-12.

Wittbrodt J., Shima A., Schartl M. (2002) Medaka - A model organism from the Far East. *Nature Reviews Genetics* 3:53-64.

II. Synthèse des résultats et lien avec le chapitre n°5

Dans cette étude, les réponses de deux espèces, l'esturgeon européen *Acipenser sturio* et le médaka japonais *Oryzias latipes*, à l'exposition à des sédiments de frayères d'*A. sturio* ont été comparées. Globalement les profils de réponse des deux espèces sont sensiblement les mêmes. Cette similitude de réponse est particulièrement vraie pour la proportion de larve malformées et la proportion de cellules apoptotiques. Malgré des niveaux différents entre les deux espèces en ce qui concerne la survie embryonnaire et le taux d'éclosion, le schéma est identique. Pour ces deux derniers critères une diminution est observée en présence de sédiments (témoin et issus de frayères) probablement du fait de l'adhésion de particules à la surface du chorion limitant sa perméabilité à l'oxygène. Les critères d'activité natatoire et de dommages à l'ADN ne montrent pas de différence significative entre les deux espèces.

La sensibilité du médaka japonais vis-à-vis de la qualité des sédiments est plus forte permettant de révéler des différences non visibles chez l'esturgeon européen particulièrement sur la survie embryonnaire, le succès à l'éclosion et la proportion d'individus présentant des oedèmes. Contrairement à l'esturgeon européen, qui produit des embryons en grande quantité avec une faible survie, le médaka japonais produit un faible nombre d'embryons avec une forte survie. Les proportions d'individus malformés sont similaires pour les deux espèces, cependant le spectre de malformations est différent.

Sur la base de cette étude comparative, il est possible de définir un ensemble de critères pour lesquels l'utilisation du médaka japonais permet d'éviter de recourir à des tests sur l'esturgeon européen. Parmi ces critères on trouve la survie embryonnaire et larvaire, le succès à l'éclosion, la proportion globale de malformations et la proportion de cellules apoptotiques. En revanche, certains critères comme le taux de dommages à l'ADN ou l'activité natatoire, semblent peu fiables.

Une première évaluation de la qualité des frayères testées ici permet d'observer un gradient amont-aval de toxicité pour le taux de malformations et de cellules apoptotiques particulièrement chez l'esturgeon européen. De façon générale, les plus forts effets toxicologiques sont observés pour les sites de la Garonne. Cependant, le nombre limité de sites utilisés dans cette étude ne permet pas d'avoir une idée suffisamment fine de la qualité des frayères d'esturgeon européen. Afin de déterminer la qualité des frayères des deux fleuves il est nécessaire d'augmenter le nombre de sites testés. Pour ce faire, l'utilisation exclusive du test embryonnaire médaka en sédiment contact (MELAc) est une bonne alternative.

CHAPITRE 5 : EVALUATION DE LA QUALITE DES
FRAYERES DE L'ESTURGEON EUROPEEN PAR LE
TEST EMBRYO-LARVAIRE MEDAKA

I. Préambule

L'étude réalisée dans le chapitre n°4 a permis de vérifier que le test MELAc est un moyen rapide et fiable d'évaluer la toxicité d'un sédiment. Jégo et al. (2002) ont dénombré 28 frayères potentielles en se basant sur des caractéristiques physiques. En effet, aucune reproduction d'esturgeon européen n'a été observée directement sur les frayères décrites par ces auteurs. Quinze de ces zones se situent en Garonne et 13 en Dordogne. Parmi celles-ci, 3 frayères de Garonne et 4 de Dordogne se situent en zone de marée dynamique.

Du fait du grand nombre de frayères potentielles, seules onze d'entre elles ont été sélectionnées afin d'en tester leur toxicité. Pour certaines frayères proches les unes des autres, un seul site a été testé. En supposant une accumulation des pollutions le long d'un gradient amont-aval, les sites les plus amonts et ceux les plus avals en zone de marée non dynamiques ont été sélectionnés. Les sites de Bergerac (Dordogne) et Beauregard (Garonne) situés en aval d'un barrage pourraient représenter des zones de fraie potentielles (Velez Soto, 1951). Les vallées de la Garonne et de la Dordogne sont fortement anthropisées par divers types d'activités et fortement urbanisées par endroit. Les rejets industriels et domestiques ont été sélectionnés dans un rayon de 5 km en amont de chaque frayère potentielle afin d'établir un degré d'impact humain sur ces frayères. De cette manière un site fortement et un site faiblement impactés ont été échantillonnés sur chaque fleuve. Seule une espèce, l'esturgeon atlantique *Acipenser oxyrinchus*, semble capable de se reproduire en zone de marée dynamique (Kieffer and Kynard, 1996; Bain, 1997). L'esturgeon atlantique et l'esturgeon européen sont deux espèces proches en terme de phylogénie et de mode de vie (Wuertz et al., 2011). Ainsi un site en zone de marée dynamique a été sélectionné sur chaque fleuve. Enfin, un sixième site, Tonneins, a été sélectionné sur la Garonne. Ce site est situé immédiatement en aval de la confluence de la rivière Lot et du fleuve Garonne. Or le Lot est connu pour être fortement contaminé au cadmium (Coynel et al., 2007) issu des carrières de zinc de Decazeville sur le Riou mort (affluent du Lot).

Article n°4 : Japanese medaka embryo-larval assay as an alternative to evaluate European sturgeon's spawning ground substratum toxicity

Delage N.^[1,2], Landi L.^[1], Le Barh R.^[2], Morin B.^[1], Jatteau P.^[2], Rochard E.^[2], Cachot J.^[1].

^[1] *University of Bordeaux, UMR CNRS EPOC 5805, avenue des Facultés, 33405 Talence cedex, France*

^[2] *IRSTEA EABX, Aquatic Ecosystems and Global Changes research unit, 50 avenue de Verdun 33612 Cestas France*

ABSTRACT

European sturgeon's reproduction area is now reduced to the Gironde-Garonne-Dordogne catchment. Its embryonic development takes place on the substratum of river. Thus, better knowledge about river sediment quality is of high importance in the context of European sturgeon restocking program. The goal of this study is to evaluate the quality of European sturgeon spawning grounds in Garonne and Dordogne river. MELAc test have been used to evaluate the putative toxicity of river sediment. Among the 28 spawning grounds of European sturgeon, 11 sediments were selected and sampled (6 from Garonne river and 5 from Dordogne river) and their toxicity was tested. Several acute and subacute endpoints were selected to evaluate toxicological effects. An artificial sediment was used as control. Differences appeared between and within rivers. Acute effects (embryonic survival and hatching success) exhibit a toxicological effect of Dordogne river sediment higher than Garonne river sediment and control. Subacute effects (malformation index, DNA strand breaks and hedgehogs proportion especially) shown higher toxicological effect in Garonne river sediment than in Dordogne river sediment and control. An upstream-downstream gradient was highlighted in 4 criteria in Dordogne river sediments and 2 criteria in Garonne river sediments. Considering this results, Garonne river seems to of better quality to complete embryonic development. The best places to incubate European sturgeon embryos should be Beauregard in Garonne river and Saint Aulaye in Dordogne. The worst site should be Pessac sur Dordogne in Dordogne river.

INTRODUCTION

European sturgeon is a anadromous fish species historically represented in every large European catchment. Its reproduction take place in fresh water up to a few months and in estuary until 4 to 8 years old. Fertilised eggs are laid in the water column and stick everywhere it fall down. Its reproduction and early life stage (ELS) development take place in very specific breeding area. Such places are characterized by a flow velocity between 0.1 and 1 m.s⁻¹, substratum is composed mainly by pebbles from 20 to 100mm and a 5m deep zone minimum. An area located downstream from a dam can be considered as a putatively suitable spawning area as well (Jego et al., 2002). These authors identified 28 places potentially considered as spawning grounds in the Gironde-Garonne-Dordogne catchment. Fifteen were identified in the downstream part of the Garonne river and 13 in the Dordogne river.

European sturgeon populations decreased dramatically during the 20th century because of human activities (Lepage et al., 2000b; Williot et al., 2002). Nowadays, only a single wild population remains in the Gironde Garonne Dordogne (GGD) basin (Williot and Castelnaud, 2011; Williot et al., 2011b). The last natural reproduction was observed in 1994. New interrogations have risen such as the putative toxicity of the sediment from spawning grounds for early life stage development (ELS) of sturgeon.

Because of recent European regulation on animals protection used in scientific experiments (EC, 2010) and their high sensitivity to pollutants, fish embryos gained interest in risk assessment procedures (Embry et al., 2010; Barjhoux et al., 2012).

Sediments are generally a sink for numerous organic persistent pollutants and trace metals which are accumulated over time. These pollutants represent a threat for aquatic organisms living at the surface or in the sediment but also for those living in the water column. Some studies tried to characterize the Garonne river sediment quality (Grousset et al., 1999; Lespes et al., 2005) but none focused on sturgeon's spawning grounds locations. It is generally accepted that Dordogne river is less contaminated than Garonne river but data available on this river is even poorer than on the Garonne river. Sediment toxicity in term of lethal and sublethal effects is an important cue (Burton Jr, 1991) in the context of a population restoration program. Because of the highly protected status of European sturgeon, the difficulty to obtain embryos and the high number of spawning grounds it was impossible to evaluate the substratum quality of each breeding area of this species in the GGD. The medaka embryo larval assay in sediment contact (MELAc) represent a unique opportunity to get a large overview of sediment quality in the GGD basin (Cachot et al., 2007; Vicquelin et al., 2011; Barjhoux et al., 2012; Le Bihanic et al., 2014c). Indeed, Japanese medaka ELS are sensitive to a large variety of pollutants (Helmstetter and Halden, 1995; Farwell

et al., 2006; González-Doncel et al., 2003; González-Doncel et al., 2008; Vicquelin et al., 2011). Japanese medaka ELS development is well described, embryos have a small size and a transparent chorion, present a low maintenance cost (Wittbrodt et al., 2002) and genitors can spawn all over the year (Iwamatsu, 2004). Furthermore, the MELAc test enable to study complex matrices containing several chemicals in mixture with different toxicity and bioavailability. This assay could be used to evaluate some keys endpoints such as embryonic survival, hatching success, growth retardation and developmental abnormalities. In addition genotoxic effects can be evaluated using a comet assay as in zebrafish (Kammann et al., 2004; Kumaravel et al., 2009; Morin et al., 2011) as well as swimming behaviour (Le Bihanic et al., 2015).

The goal of this study is to evaluate embryotoxic genotoxic and developmental toxicity of sediments from European sturgeon's breeding area using the MELAc at (i) the spawning ground scale and (ii) the river scale by comparison of Garonne and Dordogne river.

MATERIAL AND METHODS

Spawning ground selection

European sturgeon breeding areas include the Garonne river with 15 putative spawning grounds and the Dordogne river with 13 putative spawning grounds (Jego et al., 2002). Spawning ground repartition is limited upstream by the Bergerac dam in the Dordogne river (211km far away from the sea) and the Beauregard step in the Garonne river (270 km far away from the sea). Even if there are very few spawning grounds in dynamic tide area are documented in other species (Kieffer and Kynard, 1996; Bain, 1997) 7 sites were selected in Jego et al (1997), 4 of them located in Garonne river and 3 in Dordogne river.

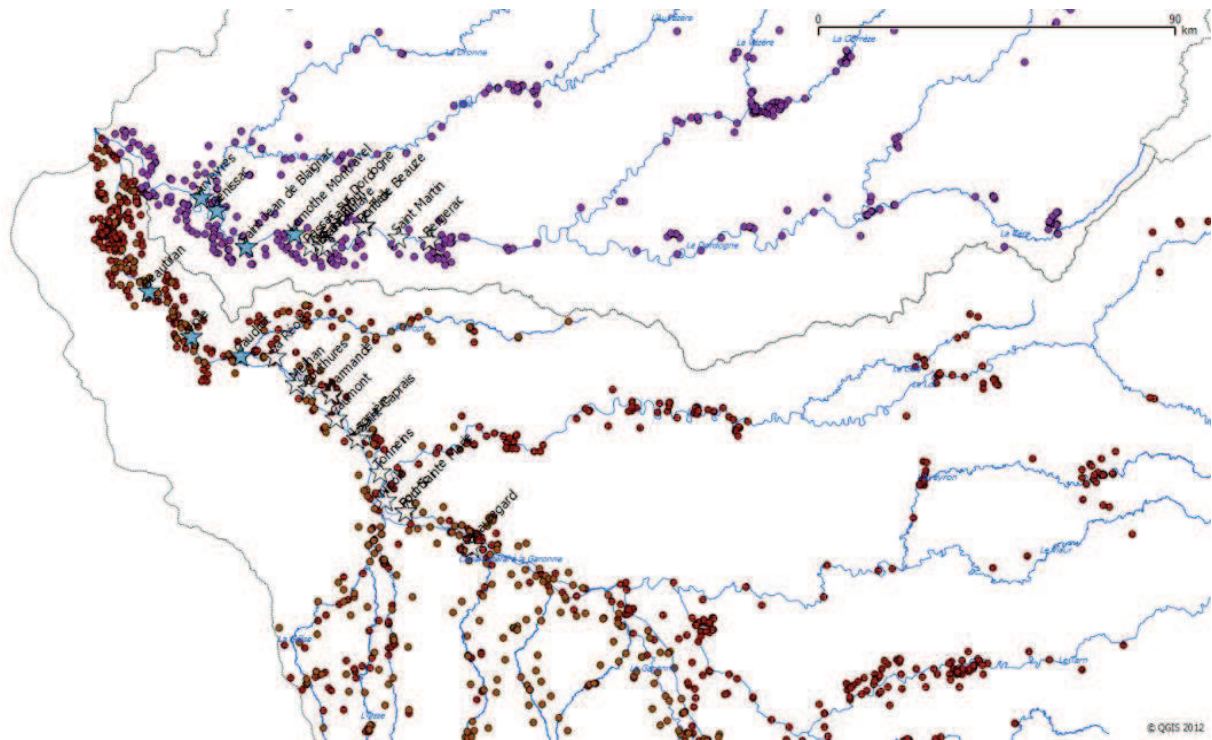


Figure 44 : Sampled spawning ground location in the Gironde-Garonne-Dordogne catchment. Red and orange points figure respectively the industrial and domestic releases in the Garonne watershed. Purple points figure industrial release in the Dordogne watershed.

Among the 28 spawning grounds identified, 11 of them were selected using a GIS (QGIS Development Team, 2012) 6 in Garonne river and 5 in Dordogne river (Table 10 and Figure 44, page 138). On each river, the most downstream and upstream sites in non-dynamic tide area have been selected. The number and the location of urban and industrial effluent discharges in the 5km upstream each sites have been recorded permitting to select the sites supposed to be the less impacted and the most impacted by human releases. As the Lot river is known to be highly contaminated by heavy metals, the first site after the confluence of the Lot and the Garonne rivers have been selected (Tonneins). Reproductions of Atlantic sturgeons have been observed in dynamic tide area. As *A. sturio* and *A. oxyrinchus* are pretty close from one another, one site in dynamic tide area have been tested.

Sediment collection

Substratum have been collected using a claw box pooled on the river bottom from a small boat (EXO7 Zodiac) or directly from the river bank as the river level was low when sampling was carried out. Three surface sediment samples were taken in each site within a 100 m² area. Sediment samples were weighted and an equal amount of each sample replicate was mixed

together before being frozen at -20°C in four aluminium dishes of 50g each (Vicquelin et al., 2011).

Table 10: Spawning grounds selected to be sampled and tested

| River | Site | Temperature (°C) | Oxygen saturation (%) | Conductivity | pH | Distance from the sea (km) | Sampling date | choice reason |
|----------|------------------------|------------------|-----------------------|--------------|-----|----------------------------|---------------|-----------------------------------|
| Garonne | Violle | 23.5 | 79.1 | 295 | 8.4 | 148 | 31/08/2012 | dynamic tide area |
| Garonne | La Réole | 24.3 | 90.2 | 275 | 8.8 | 169 | 27/08/2012 | downstream site |
| Garonne | Saint Caprais | 26.7 | NA | 261 | 9.2 | 216 | 27/08/2012 | highest number of human releases |
| Garonne | Tonneins | 25.6 | 115 | 266 | 9.2 | 222.5 | 27/08/2012 | Lot river confluence |
| Garonne | Nicole | 25.5 | 98 | 266 | 8.7 | 232 | 29/08/2012 | smallest number of human releases |
| Garonne | Beauregard | 26.9 | 122 | 266 | 8.9 | 270 | 29/08/2012 | upstream site |
| Dordogne | Saint Jean de Blaignac | 21.6 | 83.5 | 205 | 8.5 | 148 | 03/09/2012 | dynamic tide area |
| Dordogne | Pessac sur Dordogne | 24.7 | 93 | 203 | 8.7 | 169.2 | 30/08/2012 | downstream site |
| Dordogne | Saint Aulaye | 24.0 | 91.1 | 203 | 8.6 | 175.5 | 30/08/2012 | highest number of human releases |
| Dordogne | Pont de Beauze | 23.7 | 83.2 | 203 | 8.4 | 182 | 30/08/2012 | smallest number of human releases |
| Dordogne | Bergerac | 24.4 | 90.4 | 204 | 8.2 | 211 | 29/08/2012 | upstream site |

Medaka embryo-larval assay in sediment contact

Two different controls were used in this study. In one hand a blank experiment was done without substratum and in the other hand an artificial substratum composed with 2.5% dry weight (dw) *Sphalum* peat, 5% dw kaolin clay and 92.5% dw silica of 0.2 to 0.5 grain size which was specifically developed for the MELAc (Le Bihanic et al., 2014c).

Three different replicats per sample site and controls were established using Petri dishes filled with 5g of substratum and 2.5ml of ERS (culture solution developed to perform MELAc test) and equilibrate at 26°C for at least 3h. In each one of these replicates, 25 Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos were laid on a nitex grid at the surface of the sediment. Embryos have been incubated at 26°C ± 0.3°C in a climate cabinet (Economic Delux, Snijders Scientific, Tilburg, NL) with a 12h:12h photoperiod and 5000 lx white light. Experiment have been performed until complete resorption of the yolk sac of pro-larvae e.g. about 13-14 days in the aforementioned conditions (Vicquelin et al., 2011). Oxygen level was checked in each condition every day while pH was measured in each replicate at the beginning and at the end of the exposure. Each day, the nitex grid have been removed and embryos and larvae were checked using a binocular magnifier. Dead individuals were recorded daily and removed to prevent bacterial contamination. Hatched larvae were recorded each day from the first day of hatching till

the end of the experiment. Newly hatched larvae were systematically observed and pictured under a stereomicroscope MZ75 (Leica Microsystems, Nanterre, France) equipped with a colour CDD camera (Leica DFC 420C). Biometric measurement including total body length and head length, was performed with an image analysis software Leica Application Suite v2.8.1. Malformations were classified following five categories : oedema, skeletal axis malformation, jaw malformation, eye malformation and heart malformation. Occurrence of one or more malformations in a single category was scored as one. The addition of scores for each category give a malformation index notice score /5 (Le Bihanic et al., 2014c).

Comet assay

The comet assay was performed according to the protocol described in Morin et al (2011) and completed by Barjhoux et al (2012). Five 13 days old larvae per replicate were sacrificed and pooled for each comet assay analysis. Larvae were digested in a MEM-Collagenase IV 0.125% (w/v) medium and cell viability was checked by Trypan blue exclusion assay before performing the comet assay. Ethidium bromide (20µg/L) was used as DNA fluorescent tag and all coded-slides were randomly analyzed for 100 nuclei per gel (two gels per replicate) using an Olympus epifluorescent microscope (200X magnification) equipped with CCD camera (Zeiss, DE) and Komet 5.5 software. The percentage of DNA which migrate from the nucleus (%tail DNA) was used as criterion for DNA damage rate. Proportion of apoptotic cells (hedgehogs) was also reported and scored for each batch of 100 nuclei per gel.

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using R software. Replicated conditions were considered as independent experiments. Data normality was checked using the Shapiro-Wilk test and equality of variance was verified using the Bartlett test. In the case of a normal distribution of data and equality of variance, an analysis of variance was performed (ANOVA) followed by a Tukey post hoc test. When one of these criteria was not respected, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed. Data from independent conditions were considered as significantly different when $p < 0.05$. A PCA analysis was performed in order to discriminate criteria relations among themselves.

RESULTS

Embryonic and larval survival

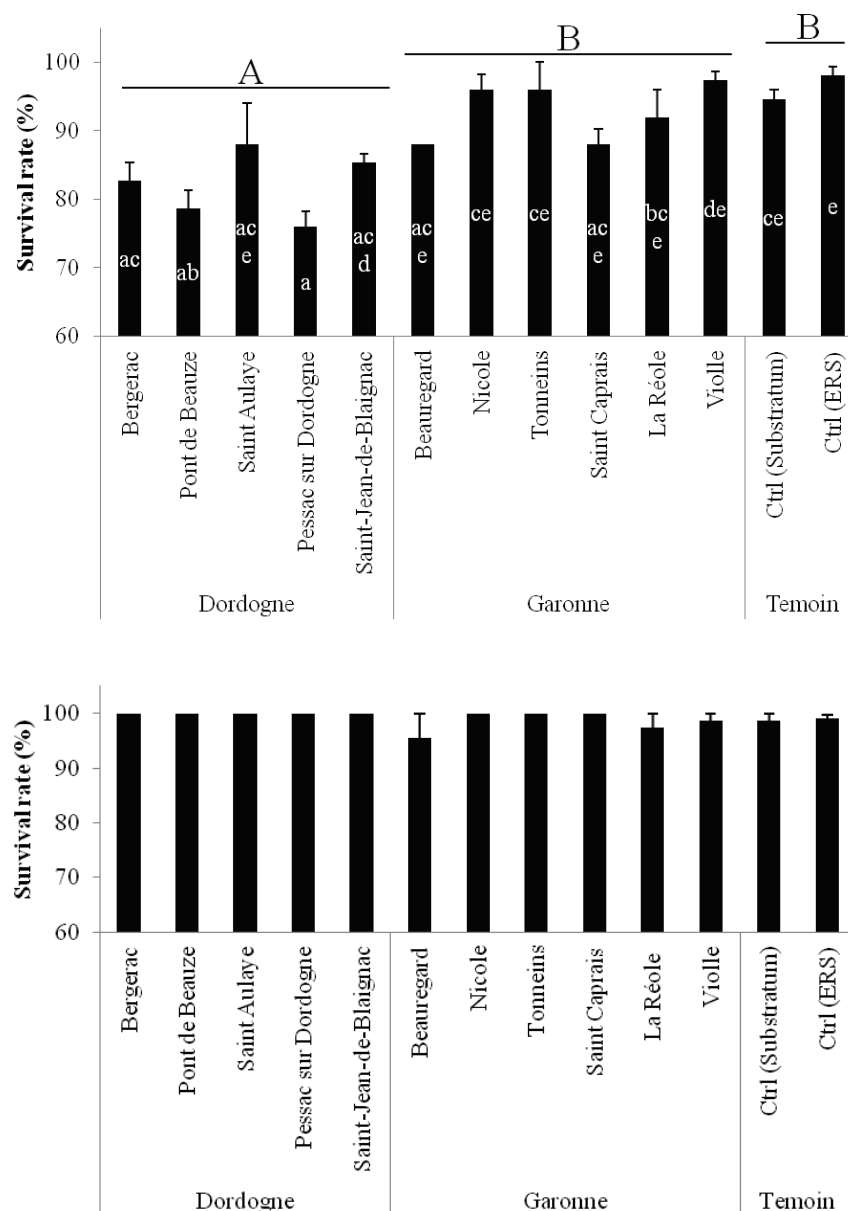


Figure 45: Embryonic (top) and larval (bottom) survival rate (mean \pm SE) following exposure to sediments from different European sturgeon spawning ground in Dordogne and Garonne rives. Data are classified by river and from the most upstream (on the left) to the most downstream sites (on the right). Significant differences between sites are expressed by minuscule letters. Capitals letters are used to indicate significant differences between rivers.

No statistical differences appeared between both control (ERS) ($98.08 \pm 1.26\%$) and control (Substratum) ($94.66 \pm 1.33\%$) conditions. Statistical differences appears between sites (Kruskal-

Wallis test, $p\text{-value} = 0.0022$) and between rivers (ANOVA, $p\text{-value} = 1.89.10^{-7}$) in embryonic survival (Figure 45, page 141). The lowest embryonic survival was observed with Pessac-sur-Dordogne substratum ($76.00 \pm 2.31\%$) and the highest is observed with the no sediment condition ($98.08 \pm 1.26\%$). Embryonic survival for Garonne river sediments was not significantly different from control while Dordogne river sediments differed from both Control and Garonne river sediments. No relation appeared between the distance from the sea and embryonic survival for both Dordogne (Pearson test $p\text{-value}=0.78$) and Garonne (Pearson test $p\text{-value}=0.16$) river sediments. In addition, no significant difference was observed between sites from a same river.

No statistical differences appeared between both control (ERS) ($99.11 \pm 0.59\%$) and control (Substratum) ($98.61 \pm 1.39\%$) conditions. No significant differences in larval survival (Figure 45, page 141) were observed between sites (ANOVA, $p\text{-value} = 0.613$) and between rivers (ANOVA, $p\text{-value} = 0.287$). No relation appeared between the distance from the sea and larval survival for both Dordogne (Pearson test $p\text{-value}=1$) and Garonne (Pearson test $p\text{-value}=0.71$) river substratum.

Hatching rate

No statistical differences appeared between both control (ERS) ($98.72 \pm 0.87\%$) and control (Substratum) ($97.33 \pm 2.67\%$) conditions for hatching rate (Figure 46, page 143). Statistical differences for hatching rate was observed between sites (Kruskal-Wallis test, $p\text{-value} = 0.0019$) and rivers (ANOVA, $p\text{-value} = 0.0002$). The lowest hatching success was observed with Pessac-sur-Dordogne substratum ($81.44 \pm 1.22\%$) and the highest was observed with the no sediment condition ($98.72 \pm 0.88\%$). Embryonic survival observed for Garonne river sediments was not significantly different from control while Dordogne river sediments differed from both Control and Garonne river sediment. No relation appeared between the distance from the sea and hatching success for both Dordogne (Pearson test $p\text{-value}=51$) and Garonne (Pearson test $p\text{-value}=0.11$) river substratum. In addition, no significant difference was observed between sites within a same river.

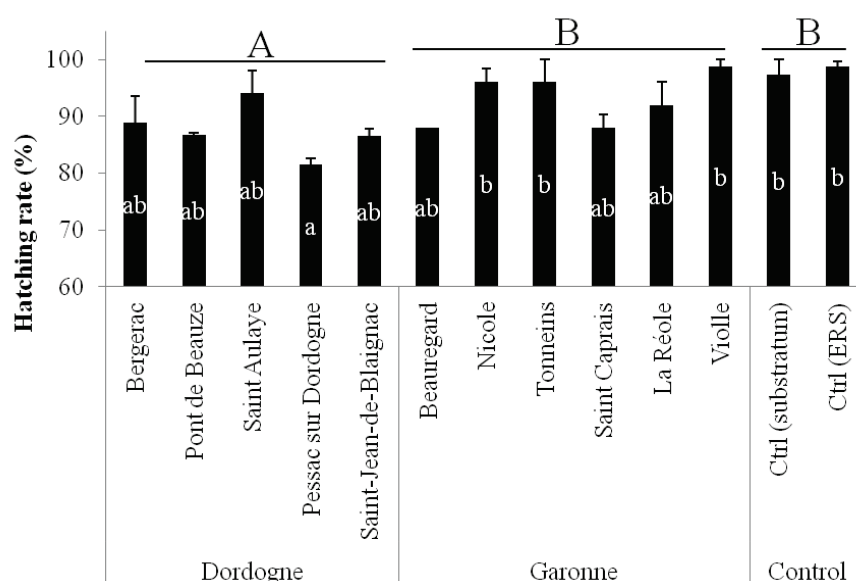


Figure 46: Hatching rate (mean \pm SE) following exposure to sediments from different European sturgeon spawning grounds in Dordogne and Garonne rivers. Data are classified by river and from the most upstream (on the left) to the most downstream site (on the right). Significant differences between sites are expressed by minuscule letters. Capital letters indicate significant difference between rivers and control.

Biometric measurements

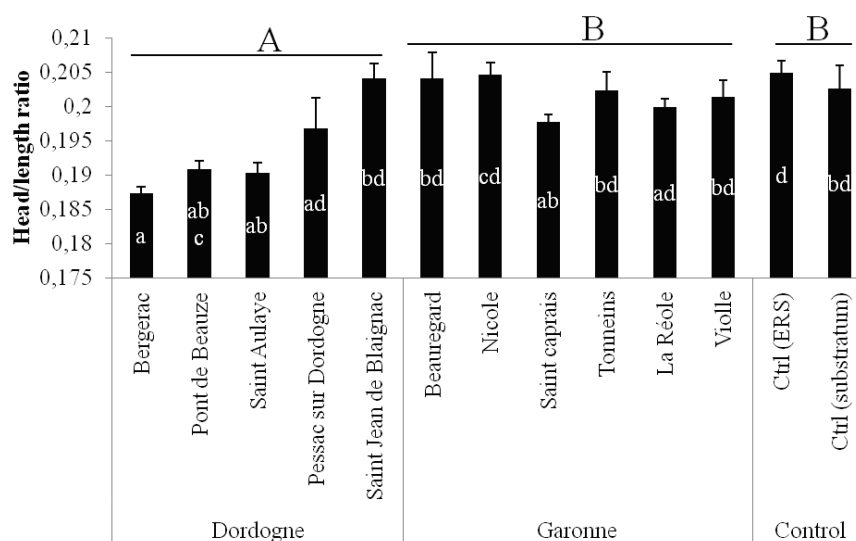


Figure 47: Head length - total body length ratio (mean \pm SE) following exposure to sediments from different European sturgeon spawning grounds in Dordogne and Garonne rivers. Data are classified by river and from the most upstream (on the left) to the most downstream site (on the right). Significant differences between sites are expressed by minuscule letters. Capital letters indicate significant difference between rivers and control.

No statistical differences appeared between both control (ERS) (0.20 ± 0.003) and control (Substratum) (0.20 ± 0.002) conditions for head length - total length ratio (Figure 47, page 143). Statistical differences for head to total body length ratio appeared between sites (Kruskal-Wallis test, p -value = 0.0081) and rivers (ANOVA, p -value = $7.75 \cdot 10^{-5}$). The lowest ratio was observed with Bergerac substratum (0.187 ± 0.001) and the highest one with the no sediment condition (0.205 ± 0.001). Head length - total length ratio for Garonne river sediments was not significantly different from controls while for Dordogne river sediments it differed from both Control and Garonne river sediments. A significant correlation was observed (Pearson test, p -value=0.0005) between the head length - total length ratio and the distance from the sea for the sediments of the Dordogne ($R^2=0.616$). This ratio increase with the decrease in distance from the sea. Indeed, medaka larvae exposed to Bergerac sediment had a significantly lower ratio than those exposed to the sediment sample from Saint Jean de Blagnac. No relation appeared between the distance from the sea and the ratio for Garonne river sediments (Pearson test p -value=0.25).

Morphological abnormalities

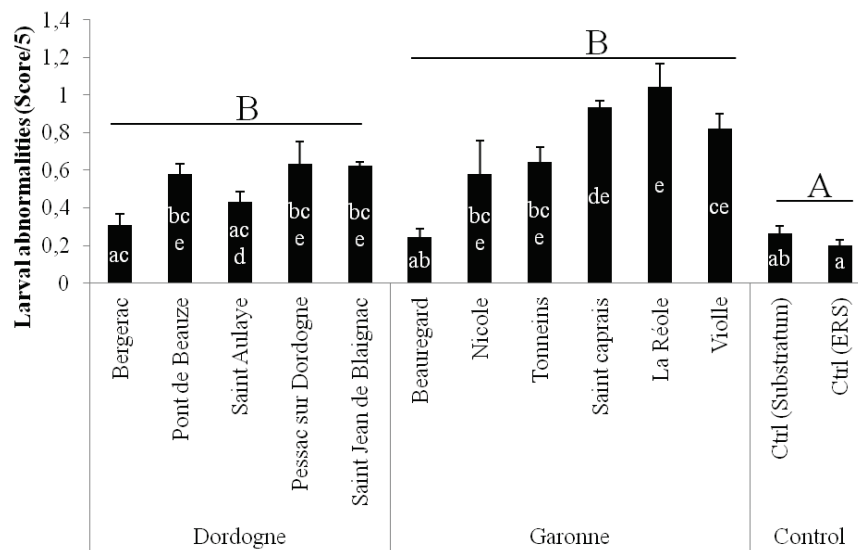


Figure 48: Malformation score/5 (mean \pm SE) following exposure to sediments from different European sturgeon spawning grounds in Dordogne and Garonne rivers. Data are classified by river and from the most upstream (on the left) to the most downstream site (on the right). Significant differences between sites are expressed by minuscule letters. Capital letters indicate significant difference between rivers and control.

No statistical differences appeared between both control (ERS) (0.2 ± 0.03) and control (Substratum) (0.26 ± 0.04) conditions in malformation index (Figure 48, page 144). Statistical differences for the malformation index was observed between sites (ANOVA test, p -value = $3.31 \cdot 10^{-8}$) and between rivers (ANOVA, p -value = $2.74 \cdot 10^{-5}$). The lowest malformation index was observed with the no sediment condition (0.2 ± 0.03) and the highest was observed with the La

Réole substratum (1.04 ± 0.12). Malformation index observed for Garonne river sediments was not significantly different from Dordogne river sediments while it significantly differed from Controls. A significant correlation was observed between the malformation index and the distance from the sea of Dordogne river substratum (Pearson test, $p\text{-value}=0.008$; $R^2=0.425$) and Garonne river substratum (Pearson test, $p\text{-value}=0.0012$; $R^2=0.492$). In both case, the malformation index increase with the decrease in distance from the sea.

DNA damage

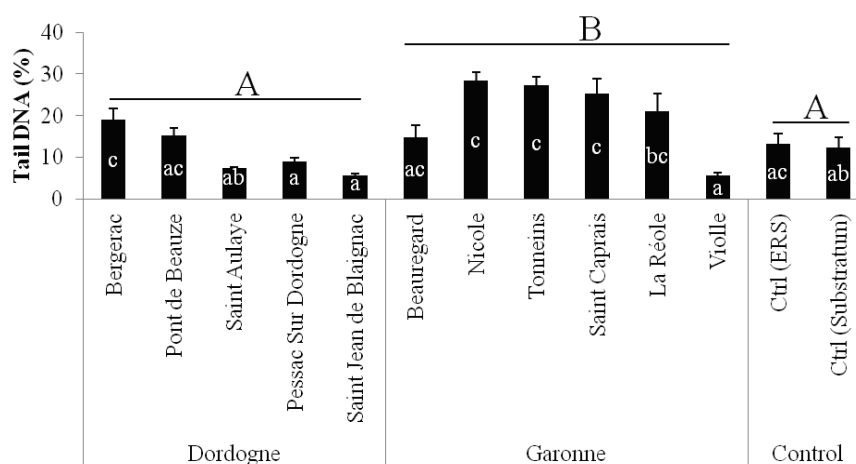


Figure 49: Proportion of DNA in comet tail (mean \pm SE) following exposure to sediments from different European sturgeon spawning grounds in Dordogne and Garonne rivers. Data are classified by river and from the most upstream (on the left) to the most downstream site (on the right). Significant differences between sites are expressed by minuscule letters. Capital letters indicate significant difference between rivers and controls.

No statistical differences appeared between control (ERS) ($13.21 \pm 2.42\%$) and control (Substratum) ($12.23 \pm 2.61\%$) conditions for DNA stand break (Figure 49, page 145). Statistical differences of DNA damage levels were observed between sites (ANOVA test, $p\text{-value} = 1.25 \cdot 10^{-8}$) and between rivers (ANOVA, $p\text{-value} = 2.02 \cdot 10^{-6}$). The lowest level was observed with Violle substratum ($5.57 \pm 0.82\%$) and the highest with Nicole substratum ($28.31 \pm 2.10\%$). Tail DNA for Dordogne river sediments was not significantly different from controls while Garonne river sediments differed from both Controls and Dordogne river sediments.

A significant correlation was observed between the proportion of DNA in comet tail and the distance from the sea of Dordogne river substratum tested (Pearson test, $p\text{-value}=1.12 \cdot 10^{-8}$; $R^2=0.694$). Tail DNA proportion decreased with the decrease in distance from the sea. No relation

appeared between the distance from the sea and tail DNA proportion for Garonne river substratum (Pearson test p -value=0.20).

Hedgehog

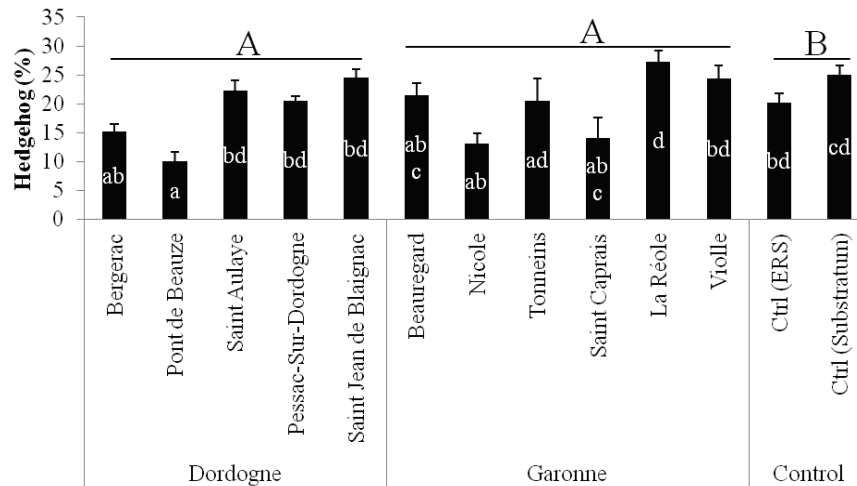


Figure 50: Proportion of hedgehogs cells in comet assay (mean ± SE) following exposure to sediments from different European sturgeon spawning grounds in Dordogne and Garonne rivers; Data are classified by river and from the most upstream (on the left) to the most downstream site (on the right). Significant differences between sites are expressed by minuscule letters. Capital letters indicate significant difference between rivers and controls.

No statistical differences appeared between both control (ERS) ($20.15 \pm 1.72\%$) and control (Substratum) ($25.08 \pm 1.45\%$) conditions for hedgehog proportion (Figure 50, page 146). Statistical differences in hedgehog proportion was observed between sites (ANOVA test, p -value = $7.46 \cdot 10^{-7}$) and between rivers (ANOVA, p -value = $1.46 \cdot 10^{-5}$). The lowest proportion was observed with Pont de Beauze substratum ($10 \pm 1.69\%$) and the highest with La Réole substratum ($27.22 \pm 1.91\%$). Hedgehog proportion for Garonne river sediments was not significantly different from Dordogne river substratum while Dordogne and Garonne river sediments differed from Controls. A significant correlation was observed between hedgehog proportion and the distance from the sea of Dordogne river substratum (Pearson test, p -value=0.001; $R^2=0.351$) and Garonne river substratum (Pearson test, p -value=0.027; $R^2=0.136$) tested. In both case, the hedgehog proportion was higher in the upstream part of each river.

DISCUSSION

The goal of this paper was to evaluate the toxicity of sediments collected from historical European sturgeon's spawning grounds. The comparison focused on the differences between eleven sites in the Dordogne and the Garonne rivers.

According to OECD (1998), larval survival and hatching success in control conditions were over 80 % and not significantly different. Oxygen saturation level was between 72 and 98 % all over the experiment and 0.5 °C temperature variation were recorded.

The first observation which can be underlined is that no significant differences appeared between the no sediment condition (Ctrl ERS) and the control sediment (Ctrl substratum) developed by Le Bihanic et al. (2014c) upon every criterion tested in this study. The use of this artificial substratum had already been validated for developmental toxicity testing in Japanese medaka and zebrafish (Le Bihanic et al., 2014a; Perrichon et al., 2014).

Dordogne river sediments induce higher acute effects than Garonne river sediments

In this study, acute and subacute effects were evaluated using different endpoints. Exposure to sediments from the Dordogne, but not from the Garonne, had significant negative effects on embryonic survival and hatching success. In contrast, no effect was observed on larval survival whatever the site or the river considered. Dordogne river sediments have a higher putative acute effects on fish embryonic development than the Garonne river sediments. Dordogne river sediments are known to be contaminated by various pollutants such as Cr, V (Grousset et al., 1999), As, Sb (Masson et al., 2009) and also PCB and PBDE (Tapie et al., 2011). Early life stages of various fish species have been shown to be especially susceptible to the toxic effects of pollutants notably trace metals (Devlin, 2006; Jezierska et al., 2009; Zhang et al., 2012) but also persistent organic pollutants (Vicquelin et al., 2011; Mhadhbi and Beiras, 2012; Barjhoux et al., 2014) which can be found in notable concentrations in aquatic sediments. Some of these compounds, such as Cr and Cd, are known to induce embryonic mortality and failure to hatch when present at high concentrations (Skinner et al., 1999).

Garonne river sediments induce higher subacute effects than Dordogne river sediments

In this study, sub-lethal effects were evaluated using the head length - total length ratio, a malformation index and the proportion of tail DNA and hedgehogs in dissociated larval cells. In three of these four endpoints Dordogne river sediments induced less deleterious effects than Garonne rivers sediments.

Considering control condition as the normal development of head and body length, Garonne river sediments induce a more harmonious development than Dordogne river sediment. Exposure to Dordogne river sediments induce a slightly lower size of the head relatively to the size of the body than normality notably in the upper part of the river. According to Jezierska et al. (2009) review, impairment of head development could be due to zinc exposure.

In term of malformation, although Dordogne and Garonne rivers sediments did not differ significantly from one another, the malformation index is largely lower for Dordogne than Garonne river sediments. Furthermore, no one of the sediments from Dordogne river differed significantly from control conditions. Malformation rate is one of the most common and sensitive indicator of developmental defects in fish embryo larval assay (Farwell et al., 2006; Agbohessi et al., 2013; Carlsson et al., 2013).

Proportion of tail DNA and hedgehog are two parameters relative to comet assay. The proportion of tail DNA is an evaluation of the importance of primary damage to DNA. Our results show that the levels of DNA damages are not significantly different between control conditions and Dordogne river sediments while Garonne river sediments induce higher genotoxicity. Increase in tail DNA proportion can be induced by many kind of pollutants such as PCB, PAH (Kammann et al., 2004) and heavy metals (Barjhoux et al., 2012). This assay is widely used to evaluate the genotoxic potential of an aquatic environment (Frenzilli et al., 2009). According to our results, the genotoxicity of Garonne river sediments is higher than Dordogne ones. Considering hedgehog proportion criterion, no significant differences appears between the two rivers tested but they are both different from the control conditions. Hedgehogs are not clearly defined and considered as apoptotic cells or cells with high level of DNA damage (Kumaravel et al., 2009).

Sediment toxicity follow a downstream upstream gradient in both river

In this study, the downstream upstream effect has been evaluated by the relationship between the criterion considered and the distance from the sea. Thus, a downstream upstream gradient appeared on two of the criteria tested in Garonne river sediments and on four criteria using Dordogne river sediments. In both rivers, a significant downstream upstream effect was observed for the malformation index and the hedgehog proportion which increased while the distance from the sea decrease. A PCA analysis performed on the variable used in this study (Figure 51, page 149) have shown correlations between embryonic survival, hatching success and head length total length ratio. Head size and hedgehog proportion were correlated. Total length and stand break proportion were oppositely correlated. Greater toxicity of the watershed effluents sampled was generally associated with more developed land surface and less open space (Skinner et al., 1999).

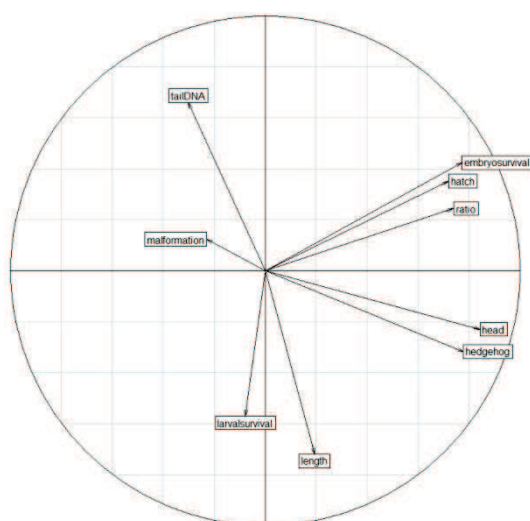


Figure 51: Correlation circle from PCA analysis. Variables used in this study are noticed as TailDNA for stand break proportion, malformation for score /5 malformation index, embryosurvival and larvalsurvival for embryonic and larval survival rate respectively, ratio is used for head length-total length ratio.

Punctual pollution sources could explain certain discrepancies in the global upstream-downstream sediment toxicity gradient. For instance, Bergerac site, in the upstream Dordogne river, is located downstream a dam which could be considered as putative source of pollution. As a result, high deleterious effects are observed using Bergerac sediment.

Table 11: Summary indicating for each site the number of acute or subacute effect that appeared significantly different from Ctrl (Substratum) condition. The total score was established adding one time the number of subacute effects and two times for acute effects. The higher is the total score, the more unfavourable is the site.

| River | Site | Acute effects | Subacute effects | Total |
|-------|------|---------------|------------------|-------|
|-------|------|---------------|------------------|-------|

| | | | | |
|----------|------------------------|---|---|---|
| Dordogne | Saint Aulaye | 0 | 0 | 0 |
| Dordogne | Saint Jean de Blaignac | 0 | 0 | 0 |
| Garonne | Beauregard | 0 | 0 | 0 |
| Garonne | Tonneins | 0 | 1 | 1 |
| Garonne | La Réole | 0 | 1 | 1 |
| Garonne | Violle | 0 | 1 | 1 |
| Garonne | Nicole | 0 | 2 | 2 |
| Garonne | Saint Caprais | 0 | 2 | 2 |
| Dordogne | Bergerac | 0 | 3 | 3 |
| Dordogne | Pont de Beauze | 1 | 1 | 3 |
| Dordogne | Pessac | 2 | 0 | 4 |

In a previous study, effects of four sites on various endpoints were compared between Japanese medaka and European sturgeon. According to the results from this study, malformation index is the most relevant endpoint in this two species comparison. Thus, in the context of the evaluation of European sturgeon's spawning grounds toxicity, a particular attention may be given to the malformations indexes.

On the basis of previous study and the results of the present one, it can be conclude that the most unfavourable site for European sturgeon early stage development is located un downstream Dordogne river (at Pessac site). Whereas the most favourable site would be located in upstream Garonne river (at Beauregard site). Garonne river is susceptible to induce higher survival than Dordogne river (Table 11).

Considering European sturgeon as the target species of this evaluation, the capacity of each spawning ground to receive numerous reproductions have to be taken in account. The major part of this species spawning grounds are located in Garonne river as well as the larger ones.

CONCLUSION

According to the PCA analysis, some criteria are very closely linked with one another. For instance, embryonic survival, hatching success and head length-total length ratio are related. In this way, criteria evaluation should be reduced to the most relevant criteria such as embryonic survival rate, hedgehog rate, total length, malformation index and stand break proportion.

Dordogne river sediment exhibit higher acute effects than Garonne river sediment. Interestingly high toxicological effects can be spotted in some site of Dordogne river especially. These spot of toxic effect should be due to punctual pollution sources. These kind of effect are not observed in Garonne river sediment probably because of the higher flux of the river.

MELAc test used in this study represent an interesting alternative to target species as European sturgeon or any endangered fish species. Such test generalization should allow fast, confident and repeatable opinion on a location global status.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by Région Aquitaine and ANR (ANR CESA (Sturtop project, ANR-13-CESA-0018-01)).

LITERATURE CITED

- Agbohessi P.T., Imorou Toko I., Houndji A., Gillardin V., Mandiki S.N.M., Kestemont P. (2013) Acute toxicity of agricultural pesticides to embryo-larval and juvenile african catfish clarias gariepinus. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64:692-700.
- Bain M.B. (1997) Atlantic and shortnose sturgeons of the Hudson River: Common and divergent life history attributes. *Environmental Biology of Fishes* 48:347-358.
- Barjhoux I., Baudrimont M., Morin B., Landi L., Gonzalez P., Cachot J. (2012) Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79:272-82.
- Barjhoux I., Cachot J., Gonzalez P., Budzinski H., Le Menach K., Landi L., Morin B., Baudrimont M. (2014) Transcriptional responses and embryotoxic effects induced by pyrene and methylpyrene in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) early life stages exposed to spiked sediments. *Environmental Science and Pollution Research* 21:13850-13866.
- Burton Jr G.A. (1991) Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10:1585-1627.
- Cachot J., Law M., Pottier D., Peluhet L., Norris M., Budzinski H., Winn R. (2007) Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the λ transgenic medaka. *Environmental Science and Technology* 41:7830-7836. DOI: 10.1021/es071082v.
- Carlsson G., Patring J., Kieuger J., Norrgren L., Oskarsson A. (2013) Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology* 126:30-41. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.10.008.

- Devlin E.W. (2006) Acute toxicity, uptake and histopathology of aqueous methyl mercury to fathead minnow embryos. *Ecotoxicology* 15:97-110.
- EC. (2010) Directive 2010/63/EC of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used in scientific purposes. official Journal of the European Communities L273.
- Embry M.R., Belanger S.E., Braunbeck T.A., Galay-Burgos M., Halder M., Hinton D.E., Léonard M.A., Lillicrap A., Norberg-King T., Whale G. (2010) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology* 97:79-87. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.12.008.
- Farwell A., Nero V., Croft M., Bal P., Dixon D.G. (2006) Modified Japanese medaka embryol larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51:600-607.
- Frenzilli G., Nigro M., Lyons B.P. (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 681:80-92.
- Grousset F.E., Jouanneau J.M., Castaing P., Lavaux G., Latouche C. (1999) A 70 year record of contamination from industrial activity along the Garonne River and its tributaries (SW France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 48:401-414.
- Iwamatsu T. (2004) Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of development* 121:605-618.
- Jego S., Gazeau C., Jatteau P., Elie P., Rochard E. (2002) Spawning grounds available for the European sturgeon *Acipenser sturio* L. 1758 in the Garonne-Dordogne Basin. Methods used, present status and prospects. Les frayères potentielles de l'esturgeon Européen *Acipenser sturio* L. 1758 dans le Bassin Garonne-Dordogne. Méthodes d'investigation, état actuel et perspectives:487-505.
- Jego S., Gazeau C., Rochard E., Elie P., Puivif P.-A., Viry B. (1997) Opération II : Etat des frayères et propositions de restauration et protection. Rapport final Life Sturio Operation II.
- Jezierska B., Ługowska K., Witeska M. (2009) The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiology and Biochemistry* 35:625-640.
- Kammann U., Biselli S., Hühnerfuss H., Reineke N., Theobald N., Vobach M., Wosniok W. (2004) Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environmental Pollution* 132:279-287.

- Kieffer M.C., Kynard B. (1996) Spawning of the shortnose sturgeon in the Merrimack River, Massachusetts. *Transactions of the American Fisheries Society* 125:179-186.
- Kumaravel T., Vilhar B., Faux S., Jha A. (2009) Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25:53-64. DOI: 10.1007/s10565-007-9043-9.
- Le Bihanic F., Morin B., Cousin X., Le Menach K., Budzinski H., Cachot J. (2014a) Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout. *Environmental Science and Pollution Research* 21:13720-13731.
- Le Bihanic F., Perrichon P., Landi L., Clérandeau C., Le Menach K., Budzinski H., Cousin X., Cachot J. (2014b) Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. *Environmental Science and Pollution Research*:1-14.
- Le Bihanic F., Sommard V., Perrine D.L., Pichon A., Grasset J., Berrada S., Budzinski H., Cousin X., Morin B., Cachot J. (2015) Environmental concentrations of benz[a]anthracene induce developmental defects and DNA damage and impair photomotor response in Japanese medaka larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113:321-328.
- Lepage M., Rochard E., Castelnaud G. (2000) Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 restoration and gravel extraction in the Gironde estuary. *Boletín - Instituto Español de Oceanografía* 16:175-179.
- Lespes G., Bancon-Montigny C., Aguerre S., Potin-Gautier M. (2005) Organotin speciation in waters and sediments in the Adour-Garonne basin. *Spéciation des organoétains dans les eaux et sédiments du bassin Adour-Garonne* 18:47-63.
- Masson M., Schäfer J., Blanc G., Dabrin A., Castelle S., Lavaux G. (2009) Behavior of arsenic and antimony in the surface freshwater reaches of a highly turbid estuary, the Gironde Estuary, France. *Applied Geochemistry* 24:1747-1756.
- Mhadhbi L., Beiras R. (2012) Acute toxicity of seven selected pesticides (alachlor, atrazine, dieldrin, diuron, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, diazinon) to the marine fish (turbot, *Psetta maxima*). *Water, Air, and Soil Pollution* 223:5917-5930.
- Morin B., Filatreau J., Vicquelin L., Barjhoux I., Guinel S., Leray-Forget J., Cachot J. (2011) Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399:2235-2242.

- OECD. (1998) Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France:20.
- Perrichon P., Le Bihanic F., Bustamante P., Le Menach K., Budzinski H., Cachot J., Cousin X. (2014) Influence of sediment composition on PAH toxicity using zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryo-larval assays. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Skinner L., De Peyster A., Schiff K. (1999) Developmental effects of urban storm water in medaka (*Oryzias latipes*) and inland silverside (*Menidia beryllina*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37:227-235.
- Tapie N., Menach K.L., Pasquaud S., Elie P., Devier M.H., Budzinski H. (2011) PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere* 83:175-185.
- Vicquelin L., Leray-Forget J., Peluhet L., LeMenach K., Deflandre B., Anschutz P., Etcheber H., Morin B., Budzinski H., Cachot J. (2011) A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquatic Toxicology* 105:235-245. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.06.011.
- Williot P., Castelnaud G. (2011) Chapter 20 Historic overview of the European sturgeon *Acipenser sturio* in France: surveys, regulations, reasons for the decline, conservation, and analysis, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 285-308.
- Williot P., Rouault T., Brun R., Pelard M., Mercier D. (2002) Status of caught wild spawners and propagation of the endangered sturgeon *Acipenser sturio* in France: a synthesis. *International Review of Hydrobiology* 87:515-524.
- Williot P., Rochard E., Desse-Berset N., Gessner J., Kirschbaum F. (2011) Chapter 1 Brief introduction to sturgeon with a special focus on the European sturgeon, *Acipenser sturio* L. 1758, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 3-12.
- Wittbrodt J., Shima A., Schartl M. (2002) Medaka - A model organism from the Far East. *Nature Reviews Genetics* 3:53-64.

Zhang H., Cao H., Meng Y., Jin G., Zhu M. (2012) The toxicity of cadmium (Cd 2+) towards embryos and pro-larva of soldatov's catfish (*Silurus soldatovi*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80:258-265. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.03.013.

II. Synthèse des résultats et lien avec le chapitre n°6

Dans cette étude deux contrôles ont été utilisés. Le premier, noté Ctrl (ERS), est un milieu de culture (ERS) dans lequel aucun sédiment n'a été ajouté ; il permet d'observer la survie dans des conditions optimales. Le second contrôle, noté Ctrl (Substratum), est constitué du milieu de culture et d'un sédiment artificiel spécialement développé pour le test MELAc constitué de 92,5 % poids sec (ps) de silice, 5 % ps d'argile de kaolin et de 2,5 % ps de tourbe de sphaigne sa granulométrie est comprise entre 0,2 et 0,5 mm (Le Bihanic et al., 2014c). Sur les différents critères mesurés au cours de cette étude, aucune différence significative est à noter entre les deux conditions contrôles.

Au regard des résultats obtenus dans cette étude, les sédiments de la Dordogne semblent induire d'avantage d'effet létaux que ceux de la Garonne. Une diminution de la survie embryonnaire et du taux d'éclosion est observé sur les sites de Dordogne alors que les sites de Garonne ne sont pas différents des témoins. En revanche, les effets sublétaux sont plus importants sur la Garonne. L'indice de malformation permet d'observer un fort effet tératogène des sédiments de Garonne. De même, les dommages à l'ADN sont plus importants pour les sédiments de Garonne alors que ceux induit par les sédiments de la Dordogne qui ne sont pas significativement différents des contrôles.

Les réponses obtenues lors de cette étude sont très différentes des hypothèses émises vis-à-vis de la qualité des sites *a priori*. En effet, les sites de Bergerac, Pont de Beauze (Dordogne) et Nicole (Garonne) censés être faiblement impactés par les rejets anthropiques montrent des effets toxicologiques élevés. A l'inverse le site de Saint Aulaye (Dordogne) censé être fortement impacté montre de faibles effets toxicologiques. Le plus fort effet tératogène est relevé pour les sédiments de La Réole (Garonne) en accord cette fois ci avec les hypothèses établies *a priori*.

Les concentrations en métaux relevés dans la Dordogne semblent appuyer les résultats obtenus dans cette étude, en particulier concernant les effets létaux.

En se basant uniquement sur l'impact des sédiments sur le développement du médaka japonais, cette étude ne permet pas d'évaluer l'effet de l'ensemble des polluants présents dans le milieu aquatique en raison de l'existence de nombreux toxiques hydrophiles dans la colonne d'eau. Pour cela une étude documentaire des relevés en polluants présents sur les frayères dans le sédiment, l'eau et les matières en suspension (MES) doit être réalisée sur la période de ponte de l'esturgeon européen. Les effets de l'ensemble de ces polluants doivent ensuite être analysés sur l'esturgeon européen à partir de matrices reconstituées.

CHAPITRE 6 : EVALUATION DE LA SENSIBILITE
DU STADE EMBRYO-LARVAIRE D'ESTURGEON
EUROPEEN AUX SEDIMENTS DOPES

I. Préambule

Les études précédentes (cf chapitres 4 et 5) ont montré que les sédiments du bassin Gironde-Garonne-Dordogne présentent des effets létaux et sublétaux. Une partie de ces effets peut être attribuée aux polluants contenus dans les sédiments. Les polluants susceptibles de contaminer les embryons et larves d'esturgeon européen se répartissent dans les trois compartiments du milieu aquatique, la fraction soluble et les matières en suspension de la colonne d'eau, la fraction sédimentaire et le biote. Les types de polluants rencontrés, leur forme chimique et le temps de résidence dans chacun de ces compartiments sont différents.

Parmi les principales sources de cette pollution on trouve l'activité agricole qui rejette bon nombre de produits phytosanitaires, l'industrie dont les rejets sont responsables de la contamination de l'environnement par un certain nombre de HAPs et de métaux lourds, mais aussi des contaminants non utilisés de nos jours et dont la rémanence les rend encore disponibles aujourd'hui comme les PCBs et pesticides organochlorés.

L'impact d'un polluant dépend de nombreux facteurs parmi lesquels on trouve les associations chimiques entre contaminants mais aussi l'espèce et le stade de développement considérés. Ainsi, afin de connaître l'impact écotoxicologique des polluants sur les très jeunes stades d'esturgeon européen, l'exposition à des mélanges reconstitués de contaminants est nécessaire.

Dans le chapitre n°5, le site de La Réole (Garonne) a été identifié comme provoquant les plus forts effets tératogènes sur les embryons d'esturgeon. La tératogénicité est un des révélateurs de la contamination du milieu. Les concentrations en polluants dans les différents compartiments sur le site de La Réole ont été relevées pour les mois de mai et juin.

Au cours de cette expérimentation, deux voies de contamination ont été utilisées. Un mélange de polluants hydrophiles a été apporté en flux continu par voie aqueuse tout au long du développement et jusqu'à l'ouverture de la bouche. Un second mélange de polluants, constitué de composés hydrophobes, a été apporté par voie sédimentaire. Pour chacun de ces mélanges, trois niveaux de contamination ont été utilisés en multipliant la concentration mesurée dans l'environnement par 0,3, 1 et 3. Deux conditions témoins ont été utilisées, un blanc, dans lequel le sédiment est constitué de silice pure, et un témoin + solvant, pour lequel le sédiment a été enrobé avec le solvant (dichlorométhane) ayant servi à l'enrobage des différents mélanges de polluants.

D'autre part, le comportement d'un polluant et surtout les réponses des organismes exposés est en partie dépendant de la température du milieu. Ainsi, deux températures ont été testées dans

cette étude (20 et 23°C). Ces températures ont été sélectionnées sur la base des résultats obtenus dans le chapitre 2 de cette thèse. La température de 20 °C correspondant à l'optimum thermique et 23 °C à la limite de tolérance à partir de laquelle les premiers effets ont été observés.

Article n°5 : European sturgeon's early life stage sensitivity to spiked sediment at two different temperatures

Delage N.^{1,2}, Eveilleau E.¹, Landi L.¹, Jatteau P.¹, Rochard E.¹, Cachot J.²

¹ *IRSTEA EABX, Aquatic Ecosystems and Global Changes research unit, 50 avenue de Verdun 33612 Cestas France*

² *University of Bordeaux, UMR CNRS EPOC 5805, Allée Geoffroy Saint-Hilaire - CS 50023 - 33615 Pessac Cedex, France*

ABSTRACT

Because of a sharp decline European sturgeon population is currently present in the Gironde-Garonne-Dordogne (GGD) catchment only. Its reproduction took place in specific spawning grounds and embryos grow in contact with sediment. Embryos and larvae are exposed to different pollution sources from sediments, water and suspended matter. Many compounds can be found in the GGD catchment. European sturgeon embryos and larvae were exposed to 0.3, 1 and 3 times the environmental concentration of the main compounds from the GGD catchment. Contamination system has been built to introduce pollution from static way by the sediment and dynamic way by water column contamination. Survival and hatching success were used to assess acute effect and Routine metabolism, embryonic development duration and malformation were used as endpoints to evaluate subacute effects. Two temperatures (20 and 23 °C) were used in this study in order to evaluate the possibility of cumulated effects. No acute effects were observed because of pollutant exposure. A delay in development time is observed due to pollutant exposure. A dose dependant effect of pollutant is observed in malformation criterion. Temperature increase impaired survival and hatching success. In the case of malformation criteria, temperature reinforce the effects of pollutant. Routine metabolism at 20 °C was not impacted by pollutant exposure but an increase in oxygen consumption is observed at 23 °C. At concentration tested, effects of temperature are higher than those of pollutant. As well as many sturgeon species, European sturgeon did not express a high sensitivity to pollutants exposure.

INTRODUCTION

European sturgeon (*Acipenser sturio*) is an anadromous fish species. It was historically present in most large European catchments. However, since the beginning of the 20th century populations have been in sharp decline due to a combination of anthropogenic pressures, notably overfishing and habitat destruction (Williot and Castelnaud, 2011). All over Europe, pollutant exposure has been suspected to be one of the causes of European sturgeon's decline (Williot et al., 1997; Bronzi et al., 2011; Gessner et al., 2011) but no data support these suppositions. Nowadays, the only remaining population of European sturgeon lives in the Gironde-Garonne-Dordogne (GGD) catchment in southwest France (Lassalle et al., 2010b; Williot and Castelnaud, 2011). The species is strictly protected and listed in many conventions and European directives (Bern, OSPAR, etc.) (Rochard, 2011). The last instance of natural reproduction in the GGD catchment was observed in 1994 (Rochard et al., 2001).

Even if the GGD catchment have long time been considered as an ecological reference, chronic contamination by many compounds have been reported (Grousset et al., 1999; Durrieu et al., 2005; Maury-Brachet et al., 2008). Industrial and agricultural activity are the main sources of heavy metals contamination in the GGD catchment. Cadmium contamination, from zinc extraction activity in one of the Garonne tributary (Lot river), has been identified (Blanc et al., 1999; Grousset et al., 1999; Audry et al., 2004b; Audry et al., 2004c; Blanc et al., 2006). Wine farming activity use CuSO_4 as fungicide and consequently Cu is detected at relatively high levels in suspended particular matter of the Garonne river (Petit et al., 2013). Urban wastewater represent also an important source of metal contamination (As, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb and Zn) in the GGD catchment (Deycard et al., 2014).

According to the Adour-Garonne water agency 120 pesticides are currently detected in the GGD catchment among which 26 are highly present (Faggiano et al., 2010). Some of them are potent toxicants and have been shown to impact aquatic species. For instance, metolachlor is known to induce embryotoxicity, DNA damage, malformations and oxidative stress in *Crassostrea gigas* (Mai et al., 2012; Mai et al., 2013; Mai et al., 2014). In various fish species, sublethal exposure to glyphosate (and its degradation product, AMPA) is known to induce liver histological alteration (Nešković et al., 1996; Topal et al., 2015), metabolism affections (Gluszczak et al., 2011), erythrocyte damages (Çavaş and Könen, 2007) and oxidative stress (Webster and Santos, 2015). Metolachlor induces behavioural impairment in response consistency (Cook and Moore, 2008) and intraspecific communications (Wolf and Moore, 2002).

In a previous study, sediment toxicity of 4 different sites identified as putative spawning grounds was evaluated on European sturgeon embryos (Delage et al., in press). Teratogenic effects were reported such as an increase in malformation rate and in DNA damage especially for

La Réole sediments. The goals of this study are (i) to evaluate the possibility to create artificially a spiked sediment which act as the natural sediment extract in European sturgeon, (ii) to evaluate the sensitivity of European sturgeon early stages to different concentrations of a relevant cocktail of organic and metallic pollutants (iii) to evaluate the combine effects of pollutant exposure and temperature.

MATERIALS AND METHODS

Data collection and exposure conditions

In this study, two temperatures were selected, at one hand 20 °C corresponding to a condition close to the thermic optimum for European sturgeon early life stages (Delage et al., 2015), and in the other hand, 23 °C that is known to induce sublethal effects and which is usually found in the GGD catchment (Delage et al., 2015).

The contamination data of the Garonne river were obtained from the EPOC laboratory (University of Bordeaux) and Adour-Garonne water agency for organic pollutants and from the annual survey of the TGM laboratory (University of Bordeaux) for metals.

Embryos and larvae were exposed to two contaminant cocktails : a spiked sediment with a mixture of hydrophobic organic pollutants and the water column with a mixture of hydrophilic organic pollutant and metals. Basing on field data, three concentration levels were tested: 0.3, 1 and 3 times the environmental concentrations (Table 12). The toxicity of these environmental mixtures of pollutants was assess at two environmental contrasted temperatures 20°C and 23°C. In final, seven conditions were tested blank, solvent, 0.3X, 1X and 3X at 20°C, solvent and 1X at 23°C.

Table 12: Pollutants used in this study based on field concentrations found in La Réole sediment samples. In each category the most abundant pollutant was selected. For PCB and OCP, the most important pollutant was selected and concentration attributed correspond to the sum of concentration of all pollutant of its category. No pharmaceutical compound was found in La Réole sediment samples.

| phase | type | pollutant | contamination concentration (0,3X) | contamination concentration (1X) | contamination concentration (3X) | field concentration |
|----------|------|---------------------|--|--|--|------------------------|
| sediment | PAH | Naphtalene (ng/L) | 6.67 | 20.00 | 60.00 | 19.00 * |
| | | Phénanthrene (ng/L) | 28.33 | 85.00 | 255.00 | 83.00 * |
| | | Fluoranthene (ng/L) | 46.67 | 140.00 | 420.00 | 138.00 * |
| | | Pyrene (ng/L) | 35.00 | 105.00 | 315.00 | 105.00 * |

| | | | | | |
|----------------|---|--------|---------|---------|---------------|
| | Benzo[a]pyrene (ng/L) | 25.00 | 75.00 | 225.00 | 76.00 * |
| | Benzo[x]Fluoranthène (ng/L) | 43.33 | 130.00 | 390.00 | 131.00 * |
| | Indéno(1,2,3,c,d)pyrène (ng/L) | 20.00 | 60.00 | 180.00 | 58.00 * |
| | Méthyl-phénanthrène (ng/L) | 18.33 | 55.00 | 165.00 | 56.00 * |
| | Σ PCB PCB153 (ng/L) | 4.67 | 14.00 | 42.00 | 14.30 * |
| | Σ OCP DDT (ng/L) | 1.33 | 4.00 | 12.00 | 4.10 * |
| aqueous | Zn (µg/L) | 21.67 | 65.00 | 195.00 | 0.39-66.63 ** |
| | Ni (µg/L) | 0.67 | 2.00 | 6.00 | 0.24-1.92 ** |
| | Pb (µg/L) | 2.67 | 8.00 | 24.00 | 0-8.58 ** |
| | metal Cu (µg/L) | 0.67 | 2.00 | 6.00 | 0.59-1.82 ** |
| | As (µg/L) | 1.33 | 4.00 | 12.00 | 1.51-4.5 ** |
| | Cd (µg/L) | 0.13 | 0.40 | 1.20 | 0.01-0.4 ** |
| | Ag (µg/L) | 0.00 | 0.01 | 0.03 | 0-0.01 ** |
| | Herbicide S-métolachlore (ng/L) | 433.33 | 1300.00 | 3900.00 | 110-1300 ** |
| | Glyphosate (ng/L) | 116.67 | 350.00 | 1050.00 | 310-360 ** |
| | Insecticide Imidaclopride (ng/L) | 76.67 | 230.00 | 690.00 | 230.00 * |
| | Fungicide Tebuconazole (ng/L) | 11.33 | 34.00 | 102.00 | 32-34 ** |

Contamination of matrices

As water was renewed every day, aqueous contamination was performed by continuous addition of a heavy metal solution and pesticide solution using a peristaltic pump in the exposure unit. Sediment were prepared using the sediment spiking protocol described in (Le Bihanic et al., 2014c). For each treatment, 150g dry weight (wt) sediment was spiked with dichloromethane as solvent.

Embryo-larval assay

In this study, oocytes from one female and semen from two males were used. Fertilization of European sturgeon embryos was performed according to Delage et al. (2014). Embryos were placed immediately after fertilization in a purpose-built exposure system for European Sturgeon (Delage et al., 2014) which were saturated with pollutants solutions one day before the beginning of the experiment. The protocol for embryo larval assay was previously described in Delage et al. (2015). Three replicates of about 150 embryos were performed for each condition. A 12h light - 12h dark cycle was set and water was renewed twice a day. Water pH was dynamically regulated around 8. The water temperature was gradually modified (1°C per hour) from 18°C to reach the targeted exposure temperature within two to five hours. Temperature and oxygen saturation were checked and recorded every two minutes over the course of the experiment using a parameter

control and recorder unit (SOFREL, S550; LACROIX, Vern sur Seiche, France). Embryos were exposed to these temperature conditions from fertilization until yolk sac complete resorption.

Mortality rate was evaluate according to the number of living embryos 24h after fertilization. Dead embryos and larvae were scored every day and then remove to prevent bacterial contamination. Hatching rate was evaluated in each replicate every two hours from the first hatching event until 12 hours without any hatching events. Embryos not hatched after that time were considered as dead.

At three days post hatching (dph) larval behaviour (Ethovision X9 Noldus, Netherlands) and routine metabolism rate (RMR) were evaluated 8 respirometers simultaneously (Qubit system, Canada) using 10 larvae (Delage et al., 2015). Then, 15 larvae were measured (head and total body length) and malformations were recorded using binocular microscopy (Olympus ZX12). Three types of malformations were distinguished: oedema, skeletal axis malformations and heart malformations.

At the end of the experiment (9dph), larvae were euthanized using eugenol lethal solution.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the R software⁷ (R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Replicated conditions were considered as independent experiments. Data normality was checked using the Shapiro-Wilk test and equality of variance was verified using the Bartlett test. In case of a normal distribution of data and equality of variance, a two-way analysis of variance was performed (ANOVA) followed by a Tukey post hoc test. When one of these criteria was not fulfilled, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed, followed by a Wilcoxon test for the embryo-larval experiment.

RESULTS

Embryonic and larval survival

⁷ R Development Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>.

The two ways ANOVA performed on embryonic and larval mortality rates (Figure 52) show differences according to temperature treatment (p -value = 0.015 and 5.9×10^{-5} respectively) but not between the different pollutant concentrations tested within temperature treatment (p -value = 0.919 and 0.631 at 20 and 23°C respectively). In both case, the 23°C temperature condition exhibit the highest mortality rate over 25% in embryos and over 10% in larvae. The lowest embryonic mortality rate was observed in solvent treatment at 20°C ($20.37 \pm 1.22\%$, mean \pm SE) and in 1X-20°C treatment for larval mortality rate ($0.26 \pm 0.26\%$, mean \pm SE). The highest mortality rate was observed in 1X at 23°C for embryos ($29.59 \pm 3.51\%$, mean \pm SE) and Solvant-23°C for larvae ($10.68 \pm 3.17\%$, mean \pm SE).

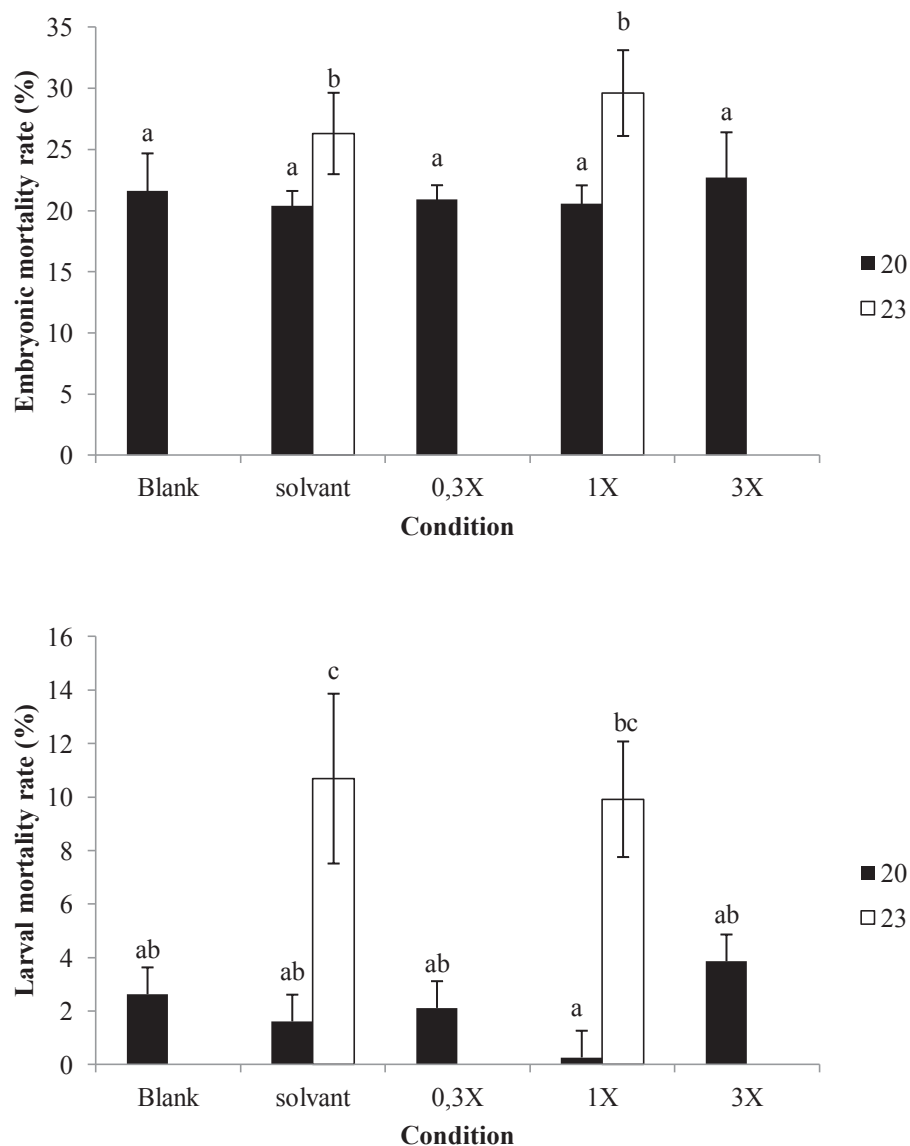


Figure 52: Embryonic (top) and larval (bottom) cumulated mortality of European sturgeon driving pollutant exposure throughout their development at two different temperatures (mean \pm SE). Statistical differences between conditions of exposure are indicated by different letters (N= 3).

Hatching rate and time of development

Significant effect of temperature on hatching success (Figure 53) was highlighted by the two way ANOVA (p-value = 0.0006). No effect of pollutant exposure was observed between conditions (p-value = 0.609). Hatching rate was always higher at 20°C than at 23°C. The highest hatching success was observed for 0.3X-20°C condition (91.44±0.78%, mean±SE) and the lowest was observed in 1X-23°C treatment (81.07±3.15%, mean±SE).

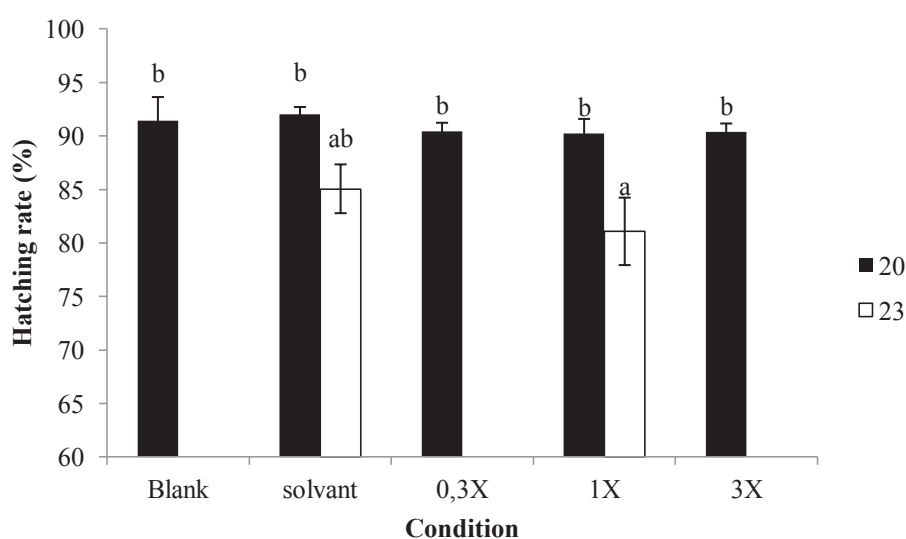


Figure 53: Hatching rate of European sturgeon embryos following pollutant exposure throughout their development at two different temperatures (mean±SE). Statistical differences between conditions are indicated by different letters (N= 3).

The two way ANOVA showed difference among temperature in the half hatching time criterion (p-value = 2.16×10^{-5}) but also between pollutant exposure conditions (p-value = 0.034) (Figure 54). At 23°C no difference appeared between solvent and 1X treatment but the half hatching time at 23°C was significantly lower than for all 20°C conditions except blank. Interestingly, a concentration-dependent increase of time to hatch was observed at 20°C. At 20°C the lowest half hatching time value was observed in the Blank condition (91.69±0.48 hpf, mean±SE) and the highest was observed in 3X-20°C condition (99.47±1.84 hpf, mean±SE).

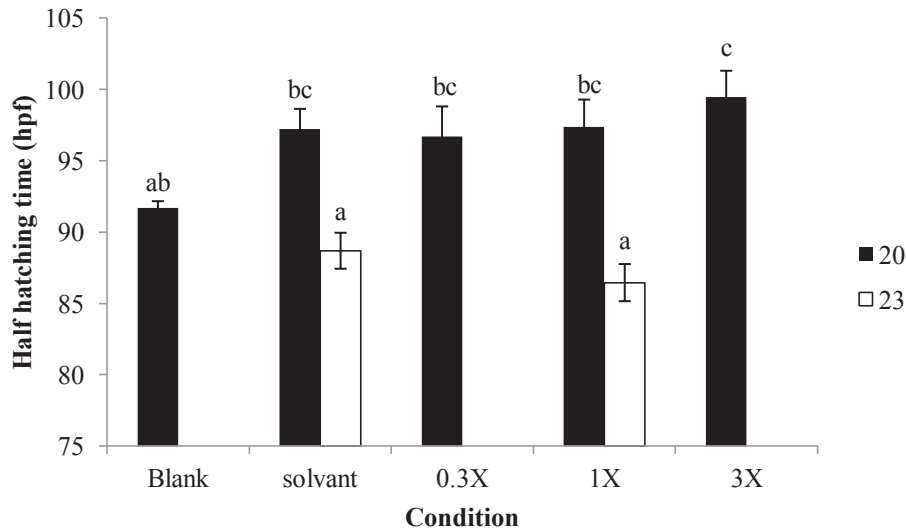


Figure 54: Half hatching time (hours post fertilization, hpf) of European sturgeon embryos following pollutant exposure throughout their development at two different temperatures (mean±SE). Statistical differences between conditions are indicated by different letters (N= 3).

Malformation index

According to the two ways ANOVA performed on malformation index score /3 (Figure 55) there were statistical differences between temperatures tested (p-value = 0.012) and pollutant exposure conditions within temperature (p-value = 0.0008). Considering the effect of temperature, an increase of malformation index was observed at 23°C compared to 20°C. At 20°C, the malformation index increase in a dose-dependent manner. The lowest value was observed in Blank condition (0.16 ± 0.05 , mean±SE) while the highest was observed in 3X-20°C condition (0.71 ± 0.08 , mean±SE). At 23°C, data seems to express the same pattern as at 20°C with the highest value at 1X-23°C (0.58 ± 0.09 , mean±SE) and the lowest in Solvent condition (0.38 ± 0.04 , mean±SE).

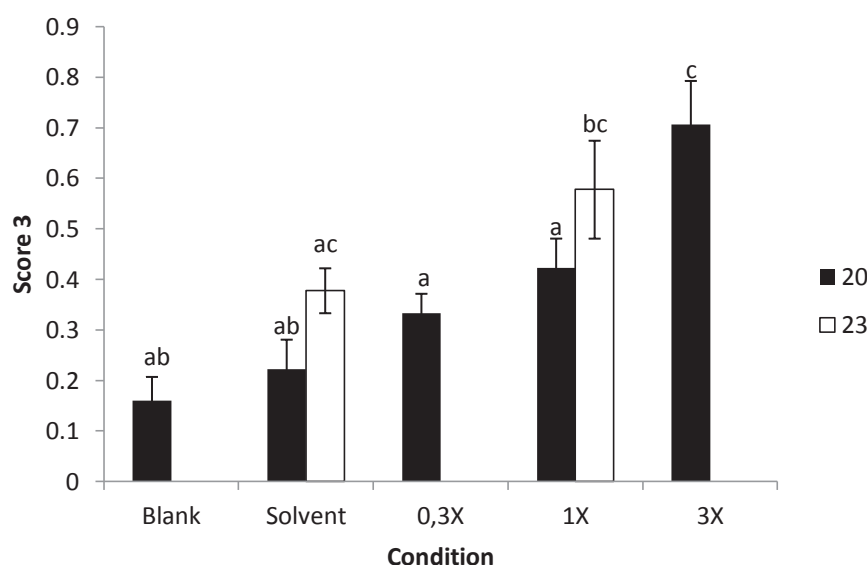


Figure 55: Malformation index score /3 of European sturgeon larvae following pollutant exposure throughout their development at two different temperatures (mean±SE). Statistical differences between conditions are indicated by different letters (N= 3).

A two way ANOVA was performed for each deformation criteria listed (Table 13). No differences were observed in every criteria (p-value > 0.05) but deformed larvae criterion and spinal deformities criterion compared to the concentration of exposure (respectively p-value = 0.005 and p-value = 0.004) and oedemata compared to temperature exposure (p-value = 0.001).

Table 13: Developmental deformities observed in larvae at hatching according to exposure conditions species. Data are expressed in proportion of impaired larvae (mean ± SE; N=3).

| T (°C) | Condition | deformed larvae | Ødemata | Spinal deformities | Craniofacial malformations | Eye abnormalities | Cardiovascular anomalies |
|--------|-----------|-----------------|----------------|--------------------|----------------------------|-------------------|--------------------------|
| 20 | Blank | 13.81 ± 4.27 a | 4.60 ± 2.31 a | 9.21 ± 2.54 a | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | Solvent | 22.22 ± 5.88 ab | 0.00 ± 0.00 a | 20.00 ± 3.85 a | 2.22 ± 2.22 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 0,3X | 31.11 ± 2.22 ab | 2.22 ± 2.22 a | 26.67 ± 3.85 ab | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 4.44 ± 2.22 |
| | 1X | 40.00 ± 7.70 bc | 4.44 ± 4.44 a | 35.56 ± 4.44 ab | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 3X | 56.98 ± 5.31 c | 13.65 ± 7.70 a | 41.27 ± 8.82 b | 2.22 ± 2.22 | 0.00 ± 0.00 | 11.27 ± 7.97 |
| 23 | Solvent | 35.56 ± 5.88 ab | 11.11 ± 2.22 b | 22.22 ± 2.22 a | 2.22 ± 2.22 | 0.00 ± 0.00 | 2.22 ± 2.22 |
| | 1X | 37.78 ± 5.88 bc | 20.00 ± 3.85 b | 20.00 ± 3.85 ab | 6.67 ± 3.85 | 4.44 ± 4.44 | 4.44 ± 2.22 |

Malformation criteria were observed using pictures as those from Figure 56, a well developed larvae (left side) has been pictured from the blank condition individuals and a plurideformed one from the 3X - 20 °C condition (center and right side).

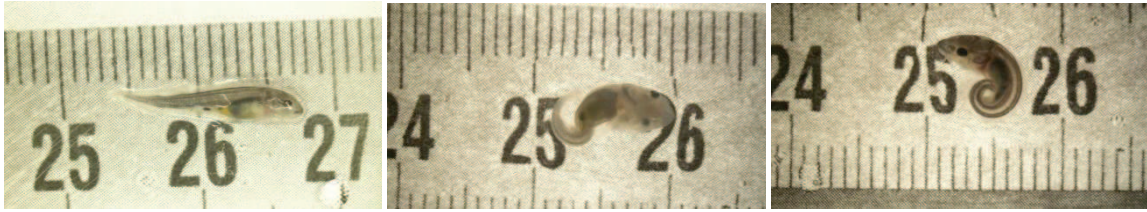


Figure 56: Comparison between a normal larvae (left) and a deformed larvae (center and right) at the same developmental stage.

Routine metabolism

Because of a technical problem to the oxygen probe, no data were recorded in solvent-20°C condition. The Two ways ANOVA performed on the oxygen consumption (Figure 57) showed differences according to temperature conditions (p-value = 0.019) but not between pollutant exposure conditions (p-value = 0.385). The oxygen consumption at 20°C did not show significant variations according to pollutant concentration. In contrast at 23°C, a steep increase of MO_2 following exposure was observed passing from 33.29 ± 5.74 mg:h/kg (mean \pm SE) at Solvent condition to 63.96 ± 3.18 mg/h/kg (mean \pm SE) at 1X-23°C condition. At 20°C, the lowest value was observed in 1X-20°C condition at 23.76 ± 4.9 mg/h/kg (mean \pm SE).

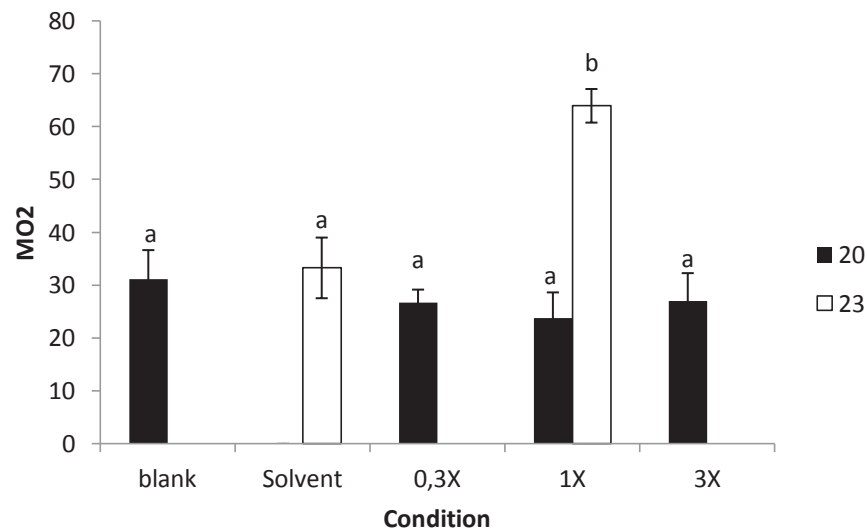


Figure 57: Evaluation of the routine metabolic rate in 2 dph larvae of European sturgeon following pollutant exposure throughout their development at two different temperatures (mean \pm SE). Statistical differences between conditions are indicated by different letters (N= 3).

Behaviour

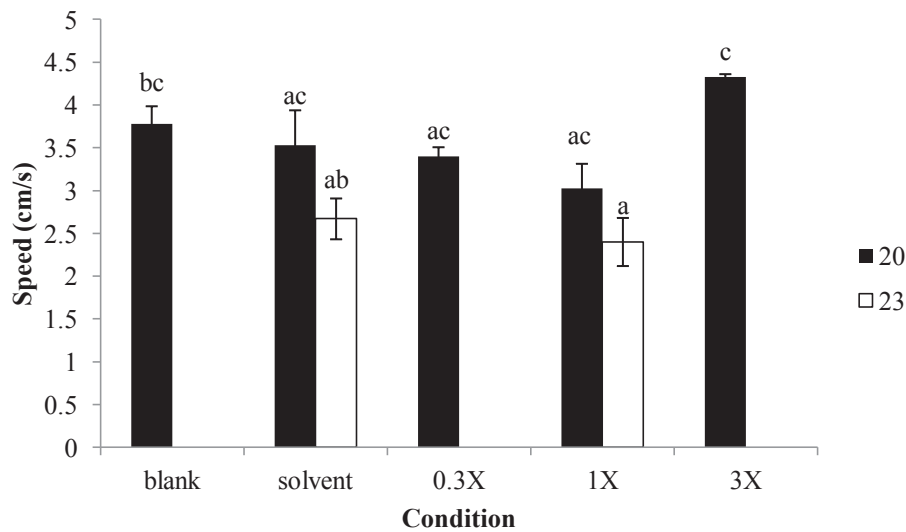


Figure 58: Evaluation of swimming speed behaviour in 2dph larvae of European sturgeon following pollutant exposure throughout their development at two different temperatures (mean±SE). Statistical differences between conditions are indicated by different letters (N= 3 and N=2 for 3X-20°C condition).

Swimming speed differed between conditions (Figure 58). The Two way ANOVA show significant differences between temperature (p-value = 0.014) but not between exposure conditions (p-value = 0.068). The swimming speed decreased as the temperature rose. No significant differences appeared between blank and solvent conditions. The highest swimming speed is observed in 3X-20°C condition with $4.33 \pm 0.03 \text{ cm.s}^{-1}$ and the lowest is observed in 1X-23°C with $2.4 \pm 0.28 \text{ cm.s}^{-1}$.

DISCUSSION

This study investigated the sensitivity of early life stages of European sturgeon to relevant conditions of pollution and temperature possibly encountered in the Gironde-Garonne-Dordogne catchment.

Effects of temperature

For each criteria tested, the effect of temperature was obvious. It has been already shown that European sturgeon early life stages exposed to 23°C exhibit subacute adverse effects such as an increase in malformation occurrence and oxygen consumption (Delage et al., 2015). Temperature of 23°C was observed to slightly increase mortality in both embryos and larvae.

These observations, like the slight decrease in hatching success, confirm the conclusion of our previous study which demonstrated the 23°C temperature as over the optimal range for sturgeon early life stage development. In white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) yolk sac larvae, a four degree increase in rearing temperature induce a decrease in survival from 84.6% at 13.5°C to 46.6% at 17.5°C (Boucher et al., 2014).

As for other poikilothermic animals, the development time of European sturgeon is dependent on temperature conditions. The higher is the temperature, the faster the development. Similar increase in growth and development has already been observed in shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) and Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) (Hardy and Litvak, 2004), green sturgeon (*Acipenser medirostris*) (Allen et al., 2006) and shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) (Kappenman et al., 2009).

In this study malformation occurrence increased because of temperature. Increase in temperature is known to induce teratogenic effects in fish early stages. For instance, in green sturgeon (*Acipenser medirostris*) increasing temperature during larval stage have been shown to induce notochord deformities (Linares-Casenave et al., 2013). Temperature increase or decrease during ontogenic development induced skeletal deformities in gilthead seabream (*Spratus aurata*) at various places (Georgakopoulou et al., 2010). In spotted halibut (*Verasper variegatus*), a three degree increased during metamorphosis induced malformations in eye migration and pigmentation of the blind side (Aritaki et al., 2004).

Oxygen consumption in the same toxicity condition largely increase between 20°C and 23°C in European sturgeon. In green sturgeon, an increase in oxygen consumption [and volitional activity] has been observed when temperature increase from 19°C to 24°C (Mayfield and Cech, 2004) due to the increase in energy requirements for growth (Cech et al., 1984) and metabolism (Crocker and Cech, 2002).

Effects of pollutant exposure

As in many sturgeon species, European sturgeon is relatively tolerant to pollutant exposure. A dose dependant response to pollutant exposure was observed with increased time to hatch at 20°C, and increased malformation index score /3 and routine metabolism rate at 23°C. It has been reported that numerous pollutants can affect ontogenesis and consequently increase developmental abnormalities in fish. For instance, exposure to selenium induced deformities especially edema and kyphosis in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and green sturgeon

(*Acipenser medirostris*) (Silvestre et al., 2010). PCB126 and TCDD exposures led to a dose-dependent impact on morphological features such as shortening body and head size in shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) and Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) (Chambers et al., 2012). In this study, exposure to environmentally-relevant mixture of pollutants induce mainly skeletal deformities and yolk sac edema. Japanese medaka embryos, *Oryzias latipes*, exposed to copper and cadmium spiked sediments developed morphological abnormalities especially spinal deformities (Barjhoux et al., 2012) just like the observations performed in this study.

A slight increase in time to hatch was observed for the 3X-20°C treatment compared to control condition. It is well known that some pollutants induce a delay in hatching time in many fishes such as fathead minnows (Fent and Meier, 1994) and Japanese medaka (Vicquelin et al., 2011). To our knowledges, no such result has already been reported in sturgeon species.

Combine effects of temperature and pollutants

In this study, combined effects of pollutants and temperature increase are obvious in metabolism and malformation evaluation especially. An increase in oxygen consumption is observed at 23°C when exposed to 1X concentration. Malformation index show an increase of contaminant effects due to temperature. In *Danio rerio*, combination of temperature and pesticide contamination induced synergetic effects on hatching rate with a dose dependant manner (Osterauer and Köhler, 2008). In coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, exposition to a combination of organophosphate, an inhibition of acetylcholinesterase production is increased when passing from 12 to 18 °C (Laetz et al., 2014). Generally speaking, effects of pollutants and synergetic effects between them are increase by natural stressors such as temperature or oxygen depletion (Holmstrup et al., 2010).

Conclusion

In this study, the sensitivity of European sturgeon early life stages to an increasing range of pollutants at two different temperatures was investigated. The impact of temperature was observed for all criteria tested while the impact of pollutants was observed only for subacute criteria. Moreover adverse effects of pollutants were observed only at concentrations three times above environmental concentrations in the Garonne river. Many sturgeon species are known to be

present in highly contaminated environment such as the Hudson river, the Mississippi river, and the Amour river, just like recent observations in the Columbia River using white sturgeon (Tompsett et al., 2014). Consequently we can assume that current contamination in the Gironde-Garonne-Dordogne catchment is not likely to adversely affect European sturgeon survival and development in normal water temperature conditions. In contrast, an increased temperature from 20 to 23°C together with exposure to environmental concentrations of pollutants could highly impair embryo aerobic metabolism.

ACKNOWLEDGMENT

ANR CESA (Sturtop project, ANR-13-CESA-0018-01) and Région Aquitaine for financial support.

CITED LITERATURE

- Allen P.J., Nicholl M., Cole S., Vlazny A., Cech Jr J.J. (2006) Growth of larval to juvenile green sturgeon in elevated temperature regimes. *Transactions of the American Fisheries Society* 135:89-96.
- Aritaki M., Ohta K., Hotta Y., Tagawa M., Tanaka M. (2004) Temperature effects on larval development and occurrence of metamorphosis-related morphological abnormalities in hatchery-reared spotted halibut *Verasper variegatus* juveniles. *Nippon Suisan Gakkaishi (Japanese Edition)* 70:8-15+97.
- Audry S., Blanc G., Schäfer J. (2004a) Cadmium transport in the Lot–Garonne River system (France) – temporal variability and a model for flux estimation. *Science of The Total Environment* 319:197-213. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00405-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00405-4).
- Audry S., Schäfer J., Blanc G., Bossy C., Lavaux G. (2004b) Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Applied Geochemistry* 19:769-786. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2003.10.002>.
- Barjhoux I., Baudrimont M., Morin B., Landi L., Gonzalez P., Cachot J. (2012) Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79:272-82.

- Blanc G., Lapaquellerie Y., Maillet N., Anschutz P. (1999) A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* 410:331-341. DOI: 10.1023/A:1003821729021.
- Blanc G., Schäfer J., Audry S., Bossy C., Lavaux G., Lissalde J.P. (2006) Le cadmium dans le Lot et la Garonne : sources et transport. *Hydroécologie Appliquée* 15:19-41.
- Boucher M.A., McAdam S.O., Shrimpton J.M. (2014) The effect of temperature and substrate on the growth, development and survival of larval white sturgeon. *Aquaculture* 430:139-148.
- Bronzi P., Castaldelli G., Cataudella S., Rossi R. (2011) The Historical and Contemporary Status of the European Sturgeon, *Acipenser sturio* L., in Italy, *Biology and Conservation of the European Sturgeon Acipenser sturio* L. 1758, Springer. pp. 227-241.
- Çavaş T., Könen S. (2007) Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22:263-268. DOI: 10.1093/mutage/gem012.
- Cech J.J., Mitchell S.J., Wragg T.E. (1984) Comparative Growth of Juvenile White Sturgeon and Striped Bass - Effects of Temperature and Hypoxia. *Estuaries* 7:12-18.
- Chambers R.C., Davis D.D., Habeck E.A., Roy N.K., Wirgin I. (2012) Toxic effects of PCB126 and TCDD on shortnose sturgeon and Atlantic sturgeon. *Environmental Toxicology and Chemistry*.
- Cook M.E., Moore P.A. (2008) The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55:94-102. DOI: 10.1007/s00244-007-9088-z.
- Crocker C.E., Cech J.J. (2002) The effects of dissolved gases on oxygen consumption rate and ventilation frequency in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Journal of Applied Ichthyology* 18:338-340.
- Delage N., Cachot J., Rochard E., Fraty R., Jatteau P. (2014) Hypoxia tolerance of European sturgeon (*Acipenser sturio* L., 1758) young stages at two temperatures. *Journal of Applied Ichthyology*:n/a-n/a. DOI: 10.1111/jai.12609.
- Delage N., Couturier B., Jatteau P., Cachot J., Rochard E. (2015) Oxythermal window drastically constraints the survival and development of European sturgeon early life stages. *Marine Biology* in press.

- Delage N., Morin B., Landi L., Gesset C., Le Barh R., Clérandeau C., Jatteau P., Rochard E., Cachot J. (in press) Embryo-larval assays with European sturgeon and Japanese Medaka to evaluate substratum quality from four sturgeon spawning grounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*.
- Deycard V.N., Schäfer J., Blanc G., Coynel A., Petit J.C.J., Lanceleur L., Dutruch L., Bossy C., Ventura A. (2014) Contributions and potential impacts of seven priority substances (As, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, and Zn) to a major European Estuary (Gironde Estuary, France) from urban wastewater. *Marine Chemistry* 167:123-134.
- Durrieu G., Maury-Brachet R., Girardin M., Rochard E., Boudou A. (2005) Contamination by heavy metals (Cd, Zn, Cu, and Hg) of eight fish species in the Gironde estuary (France). *Estuaries* 28:581-591.
- Faggiano L., de Zwart D., García-Berthou E., Lek S., Gevrey M. (2010) Patterning ecological risk of pesticide contamination at the river basin scale. *Science of the Total Environment* 408:2319-2326.
- Fent K., Meier W. (1994) Effects of triphenyltin on fish early life stages. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27:224-231.
- Georgakopoulou E., Katharios P., Divanach P., Koumoundouros G. (2010) Effect of temperature on the development of skeletal deformities in Gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 308:13-19.
- Gessner J., Spratte S., Kirschbaum F. (2011) Historic overview on the status of the European Sturgeon (*Acipenser sturio*) and its fishery in the North Sea and its tributaries with a focus on German waters, *Biology and Conservation of the European Sturgeon Acipenser sturio* L. 1758, Springer. pp. 195-219.
- Gluszczak L., Loro V.L., Pretto A., Moraes B.S., Raabe A., Duarte M.F., Da Fonseca M.B., De Menezes C.C., De Sousa Valladão D.M. (2011) Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61:624-630. DOI: 10.1007/s00244-011-9652-4.
- Grousset F.E., Jouanneau J.M., Castaing P., Lavaux G., Latouche C. (1999) A 70 year record of contamination from industrial activity along the Garonne River and its tributaries (SW France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 48:401-414.

- Hardy R.S., Litvak M.K. (2004) Effects of temperature on the early development, growth, and survival of shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, and Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*, yolk-sac larvae. *Environmental Biology of Fishes* 70:145-154.
- Holmstrup M., Bindesbøl A.M., Oostingh G.J., Duschl A., Scheil V., Köhler H.R., Loureiro S., Soares A.M.V.M., Ferreira A.L.G., Kienle C., Gerhardt A., Laskowski R., Kramarz P.E., Bayley M., Svendsen C., Spurgeon D.J. (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Science of the Total Environment* 408:3746-3762. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.10.067.
- Kappenman K.M., Fraser W.C., Toner M., Dean J., Webb M.A.H. (2009) Effect of temperature on growth, condition, and survival of juvenile shovelnose sturgeon. *Transactions of the American Fisheries Society* 138:927-937.
- Laetz C.A., Baldwin D.H., Hebert V.R., Stark J.D., Scholz N.L. (2014) Elevated temperatures increase the toxicity of pesticide mixtures to juvenile coho salmon. *Aquatic Toxicology* 146:38-44. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.10.022.
- Lassalle G., Crouzet P., Gessner J., Rochard E. (2010) Global warming impacts and conservation responses for the critically endangered European Atlantic sturgeon. *Biological Conservation* 143:2441-2452.
- Le Bihanic F., Perrichon P., Landi L., Clérandeau C., Le Menach K., Budzinski H., Cousin X., Cachot J. (2014) Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. *Environmental Science and Pollution Research*:1-14.
- Linares-Casenave J., Werner I., Van Eenennaam J.P., Doroshov S.I. (2013) Temperature stress induces notochord abnormalities and heat shock proteins expression in larval green sturgeon (*Acipenser medirostris* Ayres 1854). *Journal of Applied Ichthyology* 29:958-967.
- Mai H., Morin B., Pardon P., Gonzalez P., Budzinski H., Cachot J. (2013) Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research* 89:1-8.
- Mai H., Cachot J., Brune J., Geffard O., Belles A., Budzinski H., Morin B. (2012) Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Pollution Bulletin* 64:2663-2670.

- Mai H., Gonzalez P., Pardon P., Tapie N., Budzinski H., Cachot J., Morin B. (2014) Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. *Aquatic Toxicology* 147:48-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.024>.
- Maury-Brachet R., Rochard E., Durrieu G., Boudou A. (2008) The 'Storm of the Century' (December 1999) and the accidental escape of Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*) into the Gironde estuary (Southwest France): An original approach for metal contamination. *Environmental Science and Pollution Research* 15:89-94.
- Mayfield R.B., Cech J.J. (2004) Temperature effects on green sturgeon bioenergetics. *Transactions of the American Fisheries Society* 133:961-970.
- Nešković N.K., Poleksić V., Elezović I., Karan V., Budimir M. (1996) Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56:295-302. DOI: 10.1007/s001289900044.
- Osterauer R., Köhler H.R. (2008) Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 86:485-494.
- Petit J.C.J., Schäfer J., Coynel A., Blanc G., Deycard V.N., Derriennic H., Lanceleur L., Dutruch L., Bossy C., Mattielli N. (2013) Anthropogenic sources and biogeochemical reactivity of particulate and dissolved Cu isotopes in the turbidity gradient of the Garonne River (France). *Chemical Geology* 359:125-135.
- Rochard E. (2011) Chapter 18 Present legal status of the European sturgeon *Acipenser sturio*, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 251-256.
- Rochard E., Lepage M., Dumont P., Tremblay S., Gazeau C. (2001) Downstream migration of juvenile European sturgeon *Acipenser sturio* L. in the Gironde estuary. *Estuaries* 24:108-115.
- Silvestre F., Linares-Casenave J., Doroshov S.I., Kültz D. (2010) A proteomic analysis of green and white sturgeon larvae exposed to heat stress and selenium. *Science of the Total Environment* 408:3176-3188.
- Tompsett A.R., Vardy D.W., Higley E., Doering J.A., Allan M., Liber K., Giesy J.P., Hecker M. (2014) Effects of Columbia River water on early life-stages of white sturgeon (*Acipenser*

- transmontanus). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 101:23-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.12.004>.
- Topal A., Atamanalp M., Uçar A., Oruç E., Kocaman E.M., Sulukan E., Akdemir F., Beydemir S., Kiliç N., Erdoğan O., Ceyhan S.B. (2015) Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 111:206-214. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.027.
- Vicquelin L., Leray-Forget J., Peluhet L., LeMenach K., Deflandre B., Anschutz P., Etcheber H., Morin B., Budzinski H., Cachot J. (2011) A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquatic Toxicology* 105:235-245. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.06.011.
- Webster T.M.U., Santos E.M. (2015) Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *Bmc Genomics* 16. DOI: 10.1186/s12864-015-1254-5.
- Williot P., Castelnaud G. (2011) Chapter 20 Historic overview of the European sturgeon *Acipenser sturio* in France: surveys, regulations, reasons for the decline, conservation, and analysis, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 285-308.
- Williot P., Rochard E., Castelnaud G., Rouault T., Brun R., Lepage M., Elie P. (1997) Biological characteristics of European Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio*, as the basis for a restoration program in France. *Environmental Biology of Fishes* 48:359-370. DOI: 10.1023/a:1007392904240.
- Wolf M.C., Moore P.A. (2002) Effects of the herbicide metolachlor on the perception of chemical stimuli by *Orconectes rusticus*. *Journal of the North American Benthological Society* 21:457-467.

II. Synthèse des résultats

L'objectif de ce sixième chapitre était d'évaluer la sensibilité des stades embryo-larvaires d'esturgeon européen vis-à-vis des polluants rencontrés dans l'environnement, ainsi que l'effet combiné de la température et de l'exposition aux polluants.

Dans cette étude, les résultats doivent être comparés d'une part à la condition "témoin" (blanc), pour laquelle une exposition à du sédiment non contaminé a été réalisée, et à la condition "solvant", pour laquelle le sédiment a été dopé avec le solvant servant à l'enrobage des polluants sur le sédiment. Aucun effet significatif du solvant n'a été révélé dans cette étude quel que soit le critère de toxicité mesuré.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ne montrent pas d'effets létaux liés à l'exposition aux polluants. L'effet de la température se traduit par une diminution de la survie embryonnaire et larvaire ainsi que le succès à l'éclosion. Ces résultats semblent confirmer l'effet de la température mis en évidence dans les chapitres 2 et 3.

La sensibilité aux polluants est révélée par l'apparition d'effets sublétaux. Un fort effet dose-dépendant est observé concernant l'indice de malformation (score /3) utilisé ici. Un effet dose-dépendant apparaît également pour le temps de demi éclosion. A 20°C une augmentation significative du temps de demi éclosion est observée entre la condition témoin et la condition 3X. Cette augmentation n'est pas significative lorsque les conditions solvant et 3X sont comparées.

Un effet combiné de la température et des polluants est observé en ce qui concerne l'indice de malformation. En effet, pour une même concentration d'exposition, l'effet de la température se traduit par une augmentation du score /3. L'effet combiné de la température et des polluants se traduit également par une augmentation du taux métabolique de routine observé chez les individus exposés à la concentration environnementale 1X.

Les résultats obtenus dans cette étude se fondent sur les concentrations en polluants mesurées sur le site de La Réole. Les effets d'un mélange de polluants peuvent être évidemment très différents lorsqu'on change les composants du mélange. Cette étude permet d'appréhender la sensibilité des jeunes stades d'esturgeon européen aux polluants présents sur ce site.

Les concentrations en polluants appliquées lors de cette étude ne semblent pas suffisantes pour induire des effets létaux chez l'esturgeon européen même lorsque la concentration environnementale est multipliée par trois. Des travaux antérieurs ont documentés que les esturgeons avaient une faible sensibilité aux polluants (Tompsett et al., 2014).

DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET **PERSPECTIVES**

L'esturgeon européen *Acipenser sturio* est historiquement originaire du sud de l'Europe d'où il a colonisé les bassins versants plus au nord (Chassaing, 2010). Selon cet auteur la très large répartition historique de cette espèce serait synonyme d'une forte plasticité vis-à-vis du climat. En effet, une population d'esturgeon européen a occupé le Guadalquivir jusque dans les années 1970. Les températures moyennes de l'air pendant la période de reproduction dans cette zone sont comprises entre 21 et 26 °C (Chassaing, 2010). Bien qu'il s'agisse ici de températures de l'air, il existe une relation entre les températures de l'air et celles d'un cours d'eau (Mohseni and Stefan, 1999; Erickson and Stefan, 2000). Ainsi, la sensibilité des jeunes stades d'esturgeon européen était encore mal connue pour ce qui est de la température et complètement inexplorée pour l'oxygène et les polluants.

Ce travail de thèse avait pour objectif dans un premier temps de déterminer la sensibilité et la vulnérabilité des jeunes stades d'esturgeon européen vis-à-vis de la température et de l'oxygène. Dans le cadre du changement climatique et suite à la disparition de l'espèce dans la plupart des bassins versants de son aire d'origine, la question se pose de connaître la capacité de l'espèce à supporter les évolutions futures prévisibles des températures et de la concentration en oxygène des eaux de surface.

La dernière reproduction d'esturgeon européen observée dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne date de 1994 (Lepage and Rochard, 1995). La qualité des frayères plus de 20 ans après cette dernière reproduction connue est susceptible d'avoir évolué. Ainsi, le second objectif de cette étude était d'évaluer la qualité des frayères d'esturgeon européen et les effets potentiels des polluants présents sur ces frayères.

Les résultats obtenus apportent des éléments supplémentaires afin de répondre à quelques interrogations :

Parmi les pressions environnementales testées, laquelle représente à l'heure actuelle la plus grande menace pour le maintien de l'espèce ? Peut-on hiérarchiser ces pressions ?

La qualité actuelle des frayères dans le GGD peut-elle représenter un frein à d'éventuelles reproductions naturelles d'esturgeon européen et au développement des jeunes stades de l'espèce ?

Dans le cadre de projets de réintroduction de l'esturgeon européen au sein de son ancienne aire de répartition, comment les connaissances acquises peuvent-elles être utiles pour juger de la faisabilité de tels programmes ?

I. Hiérarchisation des risques pour les embryons et larves de *A. sturio*

L'analyse de la sensibilité à la température et à l'oxygène de façon indépendante et combinée a permis de caractériser la tolérance de l'espèce au stade embryo-larvaire.

L'optimum thermique a été évalué autour de 20°C, conformément aux suppositions établies dans la littérature mais non testées jusqu'ici (Williot et al., 2009). Les premiers effets sublétaux de la température ont été relevés en-dessous de 16°C et au-dessus de 23°C. En effet, dès ces températures, une augmentation du taux de malformations et une diminution du taux métabolique de routine sont observées. Quant aux effets létaux, ceux-ci apparaissent entre 26 et 30°C, permettant de fixer le seuil haut de sensibilité de l'esturgeon européen entre ces deux valeurs. La plus basse température testée dans cette étude (12 °C) n'a pas permis d'observer d'effet létaux, ainsi, le seuil bas de sensibilité de l'espèce ne peut, à l'heure actuelle, qu'être évalué comme étant en-dessous de 12 °C.

Il a été mis en évidence la très forte sensibilité de ce stade vis à vis de la disponibilité en oxygène. Dès 70 % O₂ sat des effets délétères apparaissent quelle que soit la température testée et dès 50 % O₂ sat aucune éclosion n'est observée. Cette forte sensibilité des jeunes stades de poissons à l'hypoxie avait déjà été mise en évidence chez plusieurs autres espèces de poissons comme *Acanthopagrus butcheri* (Hassell et al., 2008b), *Oncorhynchus mykiss* (Johnston et al., 2013) ou encore *Danio rerio* (Shang and Wu, 2004). S'il n'est pas rare de rencontrer de légères chutes de la saturation en oxygène dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne, il est en revanche peu courant de rencontrer des chutes aussi drastiques que celles induisant des effets létaux chez l'esturgeon. Ainsi, ce type de phénomène n'a été observé qu'à une seule période entre 2004 et 2011 dans le bassin Gironde-Garonne-Dordogne (années pour lesquelles nous avons pu récolter des données fiables et continues).

La sensibilité de l'esturgeon européen vis-à-vis de l'oxygène diminue au cours du développement des individus (Delage et al., 2014). En effet, les juvéniles montrent une sensibilité bien moindre et expriment les premiers effets liés à l'hypoxie en deçà de 35 % O₂ sat à 20°C et 45 % O₂ sat à 25°C.

Cette étude a également révélé les conséquences des effets combinés de ces deux facteurs. Ainsi à 90 % O₂ sat, la fréquence des malformations est dépendante de la température avec un minimum clairement établi autour de l'optimum thermique (20 °C). Pour une saturation en oxygène maintenue à 70 % O₂ sat, la température n'agit pas sur le taux individuel de déformations. Les conditions oxythermiques observées ces dernières années dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne semblent suffisantes pour permettre le développement des très jeunes stades d'esturgeon. Cependant il faut noter que trois saisons de reproduction, définies *a priori* sur

des références historiques, au cours des 20 dernières années (Figure 28, page 80) ont connues des températures au-delà des limites de tolérance de l'esturgeon européen (19 jours en 2003 et 9 jours en 2005) et des épisodes hypoxiques d'intensité trop fortes pour permettre la survie des embryons (6 jours en 2006).

L'étude de l'impact des polluants combiné à l'impact de la température a permis de déterminer que la sensibilité de l'esturgeon européen est moindre vis-à-vis des contaminants. En effet, aucun effet léthal n'a été observé consécutivement à l'exposition aux polluants et ce, même lorsque la concentration d'exposition a été multipliée par trois par rapport aux relevés effectués sur le site de La Réole. Des effets sublétaux de l'exposition aux polluants ont été relevés dans cette étude, particulièrement concernant la fréquence des malformations qui montre un effet dose dépendant. Une augmentation non significative de la fréquence de malformations est observée dès la concentration 0,3X.

La combinaison d'une élévation de température à 23°C et d'une exposition à des concentrations modérées de polluants conduit à des effets létaux et tératogènes. L'effet de la température se manifeste dès 23 °C par une diminution de la survie et du succès à l'éclosion. Un accroissement dose-dépendant de l'indice de malformation est observé et est renforcé par la combinaison de la contamination et de l'augmentation de la température. Dans le contexte du changement global, il est probable que ces conditions extrêmes soient rencontrées de plus en plus fréquemment. A terme, l'occurrence de ces conditions pourrait devenir un frein à la recolonisation des divers bassins versants par l'esturgeon européen.

Cette étude a permis de démontrer la relative tolérance des jeunes stades d'esturgeon européen à l'encontre des polluants testés. Le site de La Réole, situé à l'aval de la Garonne sur l'aire de reproduction de l'esturgeon montre cependant des concentrations faibles de contaminants organiques persistants tels que les PCB, les pesticides organochlorés, les HAPs et modérés pour certains métaux (Cd, Zn, Cu...). Expérimentalement nous n'avons pas mis en évidence d'effet léthal de ces composés aux concentrations environnementales ou même à des concentrations trois fois plus élevées. Dans les concentrations environnementales (condition 1X chapitre 6) et malgré la faible quantité de composés testés, un effet tératogène non significatif est révélé pour les deux températures testées (20 et 23 °C). Ainsi les très jeunes stades d'esturgeon européen, à l'instar de nombre d'espèces de son groupe, semblent relativement tolérant à ce type de pression (Hedayati and Jahanbakhshi, 2013; Tompsett et al., 2014). Cette conclusion est cependant à relativiser du fait que les concentrations testées, calquées sur les données environnementales dans le bassin Gironde-Garonne-Dordogne, restent relativement faibles en comparaison d'autres bassins versants.

Les résultats obtenus permettent d'établir une hiérarchie de la sensibilité des très jeunes stades d'esturgeon européen vis-à-vis des facteurs environnementaux. Ainsi, l'impact de la disponibilité en oxygène, qui apparaît dès 70 % O₂ sat, est plus fort que celui de la température, pour lequel la gamme de tolérance s'étend de moins de 12 °C à près de 26 °C. De même, l'effet de la température est plus fort que celui de micropolluants, pour laquelle aucun effet léthal n'est observé, aux concentrations environnementales actuelles.

II. Qualité des frayères

L'utilisation d'espèces modèles et notamment de poissons de laboratoire est largement répandue en toxicologie et en écotoxicologie (Goss and Sabourin, 1985). Le zebrafish (*Danio rerio*) est utilisé de longue date dans ce type d'études (Fogels and Sprague, 1977). La qualité des frayères a été évaluée au moyen d'une autre espèce modèle, le médaka japonais (*Oryzias latipes*) à la place de l'espèce cible, l'esturgeon européen. L'étude comparative des deux espèces nous a permis d'établir les similitudes et les différences dans les réponses de chacune d'elle. Le schéma de réponse des deux espèces est identique sur la majeure partie des critères testés. En termes d'effets létaux, bien que la survie et le succès à l'éclosion soient supérieurs chez le médaka que chez l'esturgeon dans les conditions de référence, la faible variabilité de réponse entre répliquas chez le médaka permet de mettre en évidence des différences significatives qui n'apparaissent pas chez l'esturgeon européen. La plus grande similarité de réponse entre les deux espèces est obtenue pour les critères d'effets sublétaux. En effet, le taux de malformations montre un profil identique entre les deux espèces et des valeurs proches les unes des autres. Les dommages à l'ADN, évalués par le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes ainsi que la proportion de cellules dites "hedgehogs" (i.e. apoptotiques) montrent de grandes similitudes entre les deux espèces. En se fondant sur l'étude de ces critères, il devient possible de comparer la qualité des frayères d'esturgeon européen par l'étude de l'effet des sédiments sur le médaka japonais.

Malgré ces similarités dans les profils de réponses entre les deux espèces, il est à noter que les seuils de réponses sont très différents entre ces deux espèces. Ainsi lorsque la survie embryonnaire du médaka japonais est proche de 80%, dans des conditions identiques, celle de l'esturgeon européen ne sera que de 40% (voir Chapitre 3). Dans le Chapitre 3 de ce travail de thèse, le test des comètes a permis d'obtenir des résultats très proches en utilisant deux matrices biologiques très différentes l'une de l'autre, les cellules isolées à partir de larves entières de médaka japonais, et le sang d'esturgeon européen. L'utilisation d'extrait d'esturgeon européen entier a montré des résultats très différents des deux autres matrices (sang d'esturgeon européen et

médaka japonais entier) que ce soit en proportion d'ADN dans la queue des comètes ou en proportion de cellules apoptotiques (résultat à prendre avec précaution du fait de la nature non définie des cellules hedgehogs (Kumaravel et al., 2009)). Cependant, la méthodologie permettant d'utiliser ce type de matrice n'a pas encore été mise au point. Il semble donc qu'une optimisation de la méthode de travail sur l'extrait d'esturgeon européen entier soit nécessaire afin de pouvoir comparer les deux espèces.

L'évaluation de la toxicité de 11 sédiments de frayères (6 issus de Garonne et 5 de Dordogne) sur embryons de médaka japonais nous a permis de hiérarchiser la qualité des différents sédiments de rivière. En effet, les sédiments de la rivière Dordogne induisent significativement davantage de mortalité embryonnaire que ceux de la rivière Garonne. Cette observation semble être confirmée par le dosage des concentrations en métaux dans ces deux rivières (échantillons en cours d'analyse). En termes d'effets sublétaux, les sédiments de la Garonne semblent plus toxiques que ceux de la Dordogne. De plus, il semble qu'un gradient d'effet toxique amont-aval existe sur la Dordogne pour ce qui est du taux de malformations ainsi que des dommages à l'ADN. Si ce gradient d'effet n'est pas statistiquement perceptible sur la Garonne, il apparaît cependant que les sédiments du site de La Réole (le plus aval) soient plus toxiques que ceux de Beauregard (le plus amont).

Les sédiments utilisés pour les tests réalisés dans le Chapitre 4 ont été collectés en avril 2012 au cours d'une année sèche, à l'inverse, ceux utilisés dans le Chapitre 3 ont été collectés en mai 2013 juste après une crue importante. Il est intéressant de constater que malgré ces changements de régimes hydrodynamiques les profils de réponses toxiques sont assez comparables pour les sites échantillonnés lors des deux campagnes. En effet, malgré le lessivage des sols dû à cette crue, les effets toxiques sur la Dordogne sont plus forts en aval qu'en amont. Dans les deux cas, le sédiment de La Réole induit le plus d'effets toxiques, particulièrement en termes de malformations induites. Ceci laisse supposer qu'il existe une certaine stabilité de la charge en contaminants contenus dans les sédiments. Les données obtenues sont quasiment identiques concernant les concentrations en POPs dans les sédiments de 2012 et 2013. De plus les concentrations en métaux semblent relativement proches au cours du temps (Audry et al., 2004a).

III. Le repeuplement d'autres bassins versants

Les connaissances acquises lors de ce travail de thèse sur la sensibilité des jeunes stades d'esturgeon européen aux facteurs environnementaux ainsi que la validation d'outil comme le test médaka permettent d'avoir un nouveau regard sur l'éventualité de repeupler d'autres bassins

versants. Les seuils oxythermiques établis permettent d'avoir une idée sur la capacité d'un bassin versant à accueillir à nouveau une reproduction naturelle de *A. sturio*.

Des chroniques de températures ont été recueillies sur cinq bassins versants de l'aire historique de répartition de l'esturgeon européen. A l'instar du travail réalisé sur le bassin Gironde-Garonne-Dordogne, le nombre de jours, au cours de la saison de reproduction, pour lequel la température de l'eau dépasse les seuils de tolérance établis a été comptabilisé (Figure 59, page 190). Selon Magnin (1962), la période de reproduction de l'esturgeon européen dans les bassins versants de la Seine et du Rhin est comprise entre les mois de juin et juillet et entre les mois de mai et juin pour la Gironde, le Rhône et le Douro. Les chroniques de températures présentées sont de longueur très variable (1910-2006 pour le Rhin, 1967-2010 pour la Seine, 1993-2011 pour la Gironde, 1979-2004 pour le Rhône et 2004-2008 pour le Douro). On constate que l'ensemble des cinq bassins versants sélectionnés montre un faible nombre de jours et d'années pour lesquels la température journalière moyenne a excédé les seuils critiques de tolérance de l'esturgeon (graphiques de gauche Figure 59, page 190). Sur les deux bassins versants les plus au nord, le nombre de jours et d'années pour lesquels la température dépasse le seuil optimum pour les températures chaudes est plus élevé. Le cas inverse est observé pour les trois bassins versants les plus au sud. De plus il est intéressant de constater l'inversion de tendance sur le Rhin. Au début du 20^{ème} siècle, l'occurrence des températures froides était prépondérante. Cette tendance s'est inversée de nos jours où il semble que les températures chaudes soient prépondérantes.

Ces constatations sont cependant à prendre avec précaution. En effet, les chroniques de températures rapportées ici sont issues de stations de mesures proches de l'embouchure des fleuves (près de Rouen pour la Seine et à Lobith pour le Rhin) ou d'un réseau de surveillance du fleuve (MAGEST et MIGADO pour la Gironde, SIE⁸ pour le Rhône et SNIRH⁹ pour le Douro). Ces mesures ne sont donc pas le reflet des températures sur les frayères d'esturgeon européen. Afin de se faire une idée précise de la capacité de l'esturgeon européen à recoloniser un bassin versant, des mesures de température, d'oxygène et de charge en polluants sur les frayères historiques ou potentielles reste nécessaire.

Pour le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne, la population d'esturgeon européen est soutenue par un repeuplement chaque année depuis 2007 (sauf en 2010 où aucune reproduction n'a eu lieu). Ce programme, initié par IRSTEA et rejoint depuis 2012 par MIGADO, a permis de

⁸ Source : Portail ADES, données exportées en mars 2007

⁹ Source : Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos

relâcher en Dordogne et Garonne plus de 1,6 millions de jeunes esturgeons européens à différents stades de développement.

Il est à noter que le facteur déclenchant la migration reproductive chez l'esturgeon européen est encore inconnu. La période de migration estimée par Magnin (1962) est variable en fonction des bassins versants. Cette variabilité peut être liée à la biologie de la population considérée et/ou à des facteurs environnementaux. Chez les oiseaux, il a été montré que la migration peut être induite par la température ou de la photopériode (Dawson, 2008). Ces derniers auteurs estiment que les capacités d'adaptation sont fortement limitées dans le cas d'une migration dépendante de la photopériode.

Nombre de jours au cours de la saison de reproduction

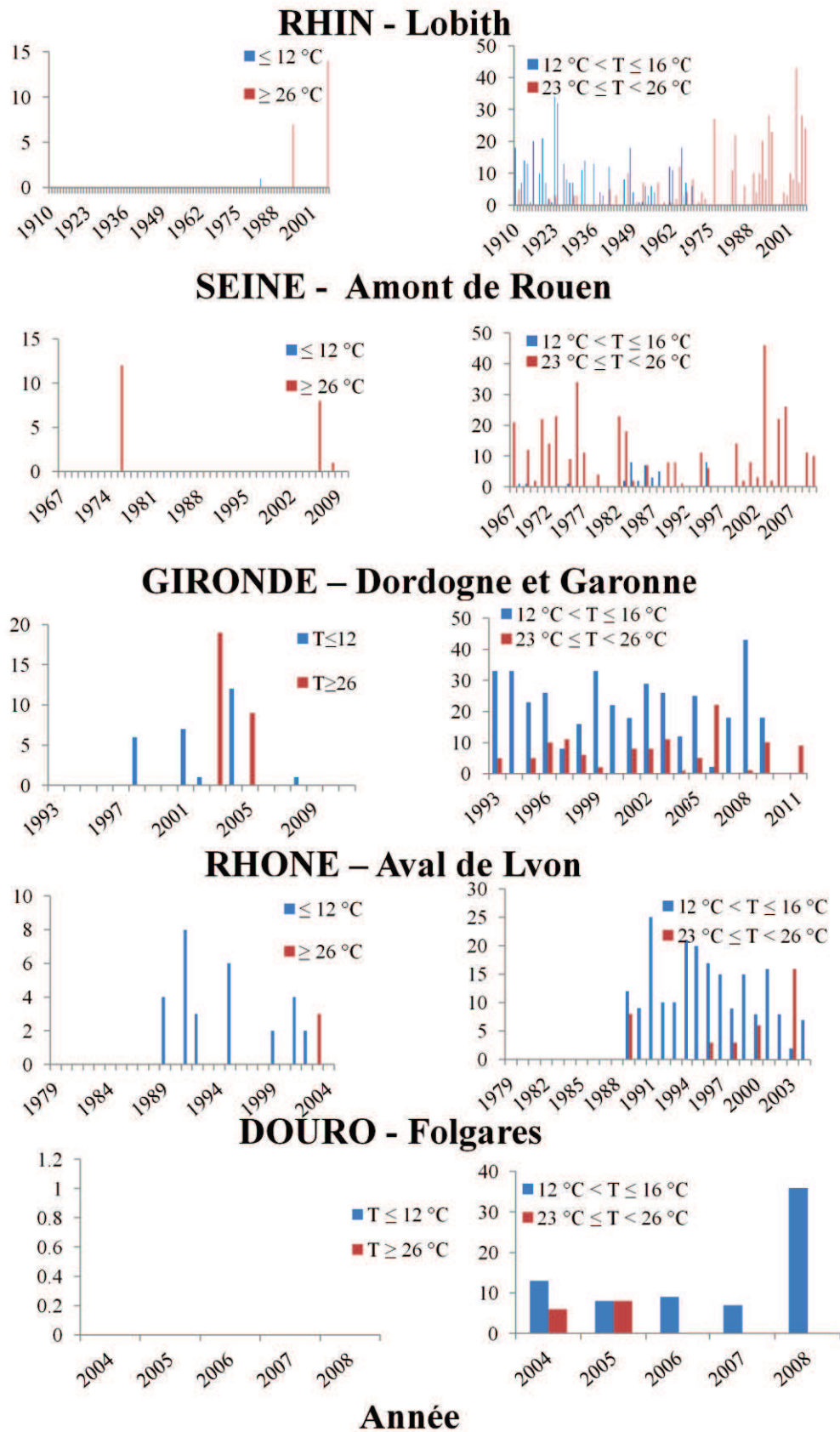


Figure 59 : Nombre de jours pour lesquels les températures des masses d'eau enregistrées dépassent les seuils de tolérance embryo-larvaire de l'esturgeon européen sur cinq bassins versants pendant la période de reproduction de l'espèce. Les données ont été mesurées pour les mois de juin et juillet pour le Rhin et la Seine et les mois de mai et juin pour la Gironde, le Rhône et le Douro en se basant sur période de reproduction estimées par

Magnin (1962). Les graphiques de gauche montrent le dépassement des seuils critiques de tolérance *TcI* et *TcII* et les graphiques de droite montrent le dépassement des seuils optimum *TpI* et *TpII*.

IV. Conclusion et perspectives

Les objectifs de cette thèse étaient de déterminer l'impact de facteurs environnementaux sur la survie et le développement des très jeunes stades d'esturgeon européen. Nous avons pu établir les seuils de sensibilité de l'espèce vis à vis de la température, de l'oxygène et d'un certain nombre de polluants environnementaux. En l'état actuel des connaissances et en prenant en compte les conditions actuelles de température, d'oxygène et de contamination des milieux, il semble que la survie et le développement des jeunes stades d'esturgeon européen ne soient pas menacés. Cependant il est à noter que ces dernières années ont vu des températures dépassant le seuil critique de survie de l'espèce, de même pour la saturation en oxygène. Dans le contexte du changement global, il est à craindre une augmentation de la fréquence de ces événements de forte température et/ou de chute drastique du niveau d'oxygène des eaux en période estivale. Ces variations de conditions oxythermiques pourraient mettre un frein à la recolonisation du bassin Gironde-Garonne-Dordogne par l'esturgeon européen. De plus, les prévisions du GIEC (2013) indiquent un changement dans le régime des intempéries pour l'Europe de l'Ouest. L'augmentation de la quantité de précipitations pourrait rendre inutilisable une partie non négligeable des frayères en modifiant le régime hydrologique et le flux de particules fines qui pourraient venir colmater les frayères. Au cours des trois saisons de reproduction de l'esturgeon qu'à couvert ce travail de thèse, les printemps 2013 et 2014 ont connu de fortes crues probablement de nature à empêcher le développement des embryons d'esturgeon européen par arrachement des substrats et apport de sédiments fins.

Au cours de ce travail, nous nous sommes appliqués à reproduire les conditions environnementales à tester dans des valeurs réalistes et à fixer les autres variables. Les variations des conditions physico-chimiques que connaît le milieu naturel n'ont pas été simulées. Afin de mieux prendre en compte ces variations, des capteurs multiparamètres ont été installés *in situ* lors de la saison de reproduction 2014, et une première tentative d'incubation *in-situ* a été réalisée. Les premiers prototypes testés n'ont pas été suffisamment fiables pour permettre une évaluation correcte de l'impact du milieu naturel et de ses variations sur les jeunes stades d'esturgeon européen. Cependant, l'amélioration de ces prototypes et des méthodes d'incubation *in-situ* pourrait permettre d'en apprendre davantage sur les capacités adaptatives de cette espèce et d'évaluer la qualité réelle d'une frayère.

Comme nous l'avons vu au travers de la seconde publication de cette thèse (Chapitre 3), l'effet du stade de développement sur la sensibilité, à l'oxygène en particulier, est très important chez l'esturgeon européen. Ainsi il serait très instructif d'étudier la gamme de tolérance vis-à-vis de la température de l'oxygène ainsi que des polluants pour les différents stades de vie de cette espèce. Une première étape a été réalisée au cours de cette thèse pour les stades embryo-larvaires et les juvéniles de 3 mois (Delage et al., 2014). Chez l'esturgeon européen, la traversée d'une zone de turbidité maximale (bouchon vaseux) est inévitable lors de la dévalaison. Cette zone, dont l'étendue varie avec la saison et la marée, est caractérisée par une très forte charge en matières en suspension et par l'occurrence de périodes hypoxiques certaines années en période d'étiage (Sottolichio and Castaing, 1999; Abril et al., 2009; Lanoux et al., 2013).

La sensibilité du stade embryo-larvaire aux polluants a été déterminée par l'étude des effets induits par exposition à des mélanges de polluants établis en se fondant sur la contamination relevée sur l'unique site de La Réole. L'utilisation d'un plus grand nombre de sites répartis sur les deux fleuves et d'un mélange plus représentatif de molécules permettrait de mieux définir cette sensibilité aux polluants.

Les données écophysiologiques et écotoxicologiques produites au cours de ce travail de thèse sont une première étape dans l'établissement des modèles prédictifs afin de vérifier le caractère favorable des frayères pour le développement des embryons et larves d'esturgeon européen. Dans cette optique le modèle DEBTox (Dynamic Energy Budget Toxicant) semble pertinent car il permet d'avoir une idée de l'impact combiné des trois facteurs considérés dans cette étude (température, oxygène et polluants) (Jager et al., 2014). Dans cette approche centrée sur l'individu, la physiologie de chaque animal est représentée au travers de la circulation des flux d'énergie (Jager and Zimmer, 2012). Cette énergie est apporté par l'alimentation. Chaque variable environnementale (température, oxygène, pH, salinité, etc...) modifie les flux d'énergie. Dans ce modèle, les polluants sont pris en compte car ils modifient l'allocation des ressources énergétiques de l'organisme. En effet, les organismes exposés vont mobiliser une partie de leur énergie pour fuir la zone contaminée ou tenter de survivre en détoxifiant et en excréant les composés toxiques et en réparant les dommages induits. En résulte une réduction de la part d'énergie pouvant être allouée aux autres activités de routine de l'individu, la croissance chez les jeunes stades, ou la reproduction pour les stades matures (Jager et al., 2006). En l'état actuel des connaissances, l'établissement de ce type de modèle est limité par la faible quantité de données toxicologiques disponibles sur les stades embryo-larvaires d'esturgeon européen, la méconnaissance des interactions entre polluants et entre polluant et matière organique, et la biodisponibilité des diverses molécules.

L'utilisation de la méthode mise en place au cours de cette étude pourrait être adaptée à d'autres espèces de poissons migrateurs telle que la grande alose (*Alosa alosa*) pour laquelle des interrogations similaires se posent. A l'instar de l'esturgeon européen, la grande alose, a connu une diminution drastique de ses effectifs en partie due à une chute du recrutement (Rougier et al., 2012). Comme pour l'esturgeon, de réelles questions se posent sur la qualité des frayères pour la reproduction de la grande alose. Si des études ont été menées sur les capacités des juvéniles de grande alose à supporter les conditions oxythermiques et la tolérance du stade embryo-larvaire vis-à-vis de la température (Jatteau et al., submitted), l'effet des polluants n'a pas à ce jour été pris en compte. De plus, l'aire de répartition de la grande alose s'étend à l'heure actuelle de façon bien plus large que celle de l'esturgeon européen. Ainsi l'utilisation d'un test rapide et fiable d'évaluation de la toxicité d'un milieu comme le test médaka, permettrait d'avoir une idée globale de la situation des frayères de grande alose.

BIBLIOGRAPHIE



- Abe T., Sakamoto T. (2011) Embryonic development and larval behavior of the kissing loach (*Parabotia curta*): Adaptations to an ephemeral, hypoxic environment. *Ichthyological Research* 58:238-244.
- Aboagye D.L., Allen P.J. (2014) Metabolic and locomotor responses of juvenile paddlefish *Polyodon spathula* to hypoxia and temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology* a 169:51-59. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.12.016.
- Abril G., Commarieu M.V., Sottolichio A., Bretel P., Guérin F. (2009) Turbidity limits gas exchange in a large macrotidal estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 83:342-348.
- Abril G., Etcheber H., Le Hir P., Bassoullet P., Boutier B., Frankignoulle M. (1999) Oxic/anoxic oscillations and organic carbon mineralization in an estuarine maximum turbidity zone (The Gironde, France). *Limnology and Oceanography* 44:1304-1315.
- Acolas M.L., Castelnaud G., Lepage M., Rochard E. (2011) Chapter 10 Biological cycle and migrations, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 147-152.
- Acolas M.L., Rouleau E., Le barh R., Bigot J.F., ballion B., Gesset C., E. R. (2012) Suivi de la population d'esturgeons européens., in: M. L. Acolas (Ed.), *Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen Acipenser sturio; bilan scientifique et technique 2011.* , Irstea, Bordeaux. pp. 24-32.
- Agbohessi P.T., Imorou Toko I., Houndji A., Gillardin V., Mandiki S.N.M., Kestemont P. (2013) Acute toxicity of agricultural pesticides to embryo-larval and juvenile african catfish *clarias gariepinus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64:692-700.
- Allen P.J., Nicholl M., Cole S., Vlazny A., Cech Jr J.J. (2006) Growth of larval to juvenile green sturgeon in elevated temperature regimes. *Transactions of the American Fisheries Society* 135:89-96.
- Almaca C., Elvira B. (2000) Past and present distribution of *Acipenser sturio* L., 1758 on the Iberian Peninsula. *Boletín Instituto Español de Oceanografía* 16:11-16.
- Almaça C. (1988) On the sturgeon, *Acipenser sturio*, in the portuguese rivers and sea. *Folia Zoologica* 37:183-191.
- Aluru N., Leatherland J.F., Vijayan M.M. (2010) Bisphenol a in oocytes leads to growth suppression and altered stress performance in juvenile rainbow trout. *PLoS ONE* 5:1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0010741.
- Anderson K.A., Hillwalker W.E. (2008) Bioavailability, in: S. E. J. D. Fath (Ed.), *Encyclopedia of Ecology*, Academic Press, Oxford. pp. 348-357.
- Anitha B., Chandra N., Gopinath P.M., Durairaj G. (2000) Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*). *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 469:1-8.
- Aritaki M., Ohta K., Hotta Y., Tagawa M., Tanaka M. (2004) Temperature effects on larval development and occurrence of metamorphosis-related morphological abnormalities in hatchery-reared spotted halibut *Verasper variegatus* juveniles. *Nippon Suisan Gakkaishi (Japanese Edition)* 70:8-15+97.
- Audry S., Blanc G., Schäfer J. (2004a) Cadmium transport in the Lot-Garonne River system (France) - Temporal variability and a model for flux estimation. *Science of the Total Environment* 319:197-213.
- Audry S., Blanc G., Schäfer J. (2004b) Cadmium transport in the Lot-Garonne River system (France) – temporal variability and a model for flux estimation. *Science of The Total Environment* 319:197-213. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00405-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00405-4).

Audry S., Schäfer J., Blanc G., Bossy C., Lavaux G. (2004c) Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Applied Geochemistry* 19:769-786. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2003.10.002>.



- Bain M.B. (1997) Atlantic and shortnose sturgeons of the Hudson River: Common and divergent life history attributes. *Environmental Biology of Fishes* 48:347-358.
- Barjhoux I. (2011) Étude de la biodisponibilité et de la toxicité de polluants chimiques à risque dans les sédiments aquatiques vis-à-vis des premiers stades de développement d'un poisson modèle, *Oryzias latipes*, Bordeaux 1.
- Barjhoux I., Baudrimont M., Morin B., Landi L., Gonzalez P., Cachot J. (2012) Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79:272-82.
- Barjhoux I., Cachot J., Gonzalez P., Budzinski H., Le Menach K., Landi L., Morin B., Baudrimont M. (2014) Transcriptional responses and embryotoxic effects induced by pyrene and methylpyrene in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) early life stages exposed to spiked sediments. *Environmental Science and Pollution Research* 21:13850-13866.
- Barnes R., King H., Carter C.G. (2011) Hypoxia tolerance and oxygen regulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* from a Tasmanian population. *Aquaculture* 318:397-401. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2011.06.003](http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.003).
- Barrionuevo W.R., Burggren W.W. (1999) O₂ consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): Influence of temperature and ambient O₂. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 276:R505-R513.
- Barron M.G., Carls M.G., Heintz R., Rice S.D. (2004) Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Toxicological Sciences* 78:60-67.
- Becker C.D., Genoway R.G. (1979) Evaluation of critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. *Environmental Biology of Fishes* 4:245-256.
- Beitinger T.L., Bennett W.A., McCauley R.W. (2000) Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes* 58:237-275.
- Billiard S.M., Meyer J.N., Wassenberg D.M., Hodson P.V., Di Giulio R.T. (2008) Nonadditive effects of PAHs on early vertebrate development: Mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicological Sciences* 105:5-23.
- Blanc G., Lapaquellerie Y., Maillet N., Anschutz P. (1999) A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* 410:331-341. DOI: [10.1023/A:1003821729021](http://dx.doi.org/10.1023/A:1003821729021).
- Blanc G., Schäfer J., Audry S., Bossy C., Lavaux G., Lissalde J.P. (2006) Le cadmium dans le Lot et la Garonne : sources et transport. *Hydroécologie Appliquée* 15:19-41.
- Bodin N., Tapie N., Le Ménach K., Chassot E., Elie P., Rochard E., Budzinski H. (2014) PCB contamination in fish community from the Gironde Estuary (France): Blast from the past. *Chemosphere* 98:66-72. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.003>.
- Borgå K. (2013) *Ecotoxicology: Bioaccumulation*☆, Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier.
- Boucher M.A., McAdam S.O., Shrimpton J.M. (2014) The effect of temperature and substrate on the growth, development and survival of larval white sturgeon. *Aquaculture* 430:139-148.
- Bronzi P., Castaldelli G., Cataudella S., Rossi R. (2011) The Historical and Contemporary Status of the European Sturgeon, *Acipenser sturio* L., in Italy, *Biology and Conservation of the European Sturgeon Acipenser sturio* L. 1758, Springer. pp. 227-241.

- Brosse L., Lepage M., Dumont P. (2000) First results on the diet of the young european sturgeon, *Acipenser sturio* Linnaeus, 1758, in the Gironde estuary. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía* 16:75-80.
- Brosse L., Taverny C., Lepage M. (2011) Chapter 11 Habitats, movements and feeding of juveniles European sturgeon (*Acipenser sturio*) in Gironde estuary, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 153-163.
- Budzinski H., Jones I., Bellocq J., Piérard C., Garrigues P. (1997) Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry* 58:85-97. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4203\(97\)00028-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4203(97)00028-5).
- Burggren W.W., Pinder A.W. (1991) Ontogeny of cardiovascular and respiratory physiology in lower vertebrates. *Annual Review of Physiology* 53:107-135.
- Burton Jr G.A. (1991) Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10:1585-1627.



- Cachot J., Law M., Pottier D., Peluhet L., Norris M., Budzinski H., Winn R. (2007) Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the λ transgenic medaka. *Environmental Science and Technology* 41:7830-7836. DOI: 10.1021/es071082v.
- Cai L., Taupier R., Johnson D., Tu Z., Liu G., Huang Y. (2013) Swimming Capability and Swimming Behavior of Juvenile *Acipenser schrenckii*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 319A:149-155. DOI: 10.1002/jez.1780.
- Cannas M., Atzori F., Rupsard F., Bustamante P., Loizeau V., Lefrançois C. (2013) PCBs contamination does not alter aerobic metabolism and tolerance to hypoxia of juvenile sole (*Solea solea* L. 1758). *Aquatic Toxicology* 127:54-60. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.04.017>.
- Carls M.G., Rice S.D., Hose J.E. (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:481-493.
- Carlsson G., Patring J., Kieuger J., Norrgren L., Oskarsson A. (2013) Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology* 126:30-41. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.10.008.
- Castelnaud G. (2011) Chapter 13 Sturgeon fishing, landings, and caviar production during the twentieth century in the Garonne Basin and the coastal sea in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 177-194.
- Çavaş T., Könen S. (2007) Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22:263-268. DOI: 10.1093/mutage/gem012.
- Cech J.J., Mitchell S.J., Wragg T.E. (1984) Comparative Growth of Juvenile White Sturgeon and Striped Bass - Effects of Temperature and Hypoxia. *Estuaries* 7:12-18.
- Chambers R.C., Davis D.D., Habeck E.A., Roy N.K., Wirgin I. (2012) Toxic effects of PCB126 and TCDD on shortnose sturgeon and Atlantic sturgeon. *Environmental Toxicology and Chemistry*.
- Chapman F.A., Carr S.H. (1995) Implications of early life stages in the natural history of the Gulf of Mexico sturgeon, *Acipenser oxyrinchus desotoi*. *Environmental Biology of Fishes* 43:407-413.

- Charpy R. (1951) Observations sur la pêche de l'esturgeon (*Acipenser sturio* L.) dans le Guadalquivir durant l'année 1950. *Bulletin Français de Pisciculture*:49-56.
- Chassaing O. (2010) Organisation génétique des populations d'esturgeon européen *Acipenser sturio* : passé, présent, futur, ENS Lyon & Université Montpellier II, Montpellier. pp. 490.
- Chaube R., Gautam G.J., Joy K.P. (2013) Teratogenic effects of 4-nonylphenol on early embryonic and larval development of the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64:554-561.
- Chèvre P., Saint-Sevin J., Mercier D., Jacobs L., Williot P. (2011) Recent Progress in Larval Rearing of the European Sturgeon, *Acipenser sturio*, Biology and Conservation of the European Sturgeon *Acipenser sturio* L. 1758, Springer. pp. 449-453.
- Ciardullo S., Aureli F., Coni E., Guandalini E., Iosi F., Raggi A., Rufo G., Cubadda F. (2008) Bioaccumulation potential of dietary arsenic, cadmium, lead, mercury, and selenium in organs and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a function of fish growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:2442-2451.
- Claireaux G., Lagardère J.P. (1999) Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *Journal of Sea Research* 42:157-168.
- Claireaux G., Lefrançois C. (2007) Linking environmental variability and fish performance: Integration through the concept of scope for activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362:2031-2041.
- Classen T.E. (1944) Estudio bio-estadístico del Esturion o sollo del Guadalquivir (*Acipenser sturio* L.). Minist. Mar. Inst. Español Oceanograf, Madrid.
- Cook M.E., Moore P.A. (2008) The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55:94-102. DOI: 10.1007/s00244-007-9088-z.
- Couillard C.M., Légaré B., Bernier A., Dionne Z. (2011) Embryonic exposure to environmentally relevant concentrations of PCB126 affect prey capture ability of *Fundulus heteroclitus* larvae. *Marine Environmental Research* 71:257-265.
- Coynel A., Schäfer J., Dabrin A., Girardot N., Blanc G. (2007) Groundwater contributions to metal transport in a small river affected by mining and smelting waste. *Water Research* 41:3420-3428.
- Crocker C.E., Cech J.J. (2002) The effects of dissolved gases on oxygen consumption rate and ventilation frequency in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Journal of Applied Ichthyology* 18:338-340.
- Czerkies P., Brzuzan P., Kordalski K., Luczynski M. (2001) Critical partial pressures of oxygen causing precocious hatching in *Coregonus lavaretus* and *C. albula* embryos. *Aquaculture* 196:151-158.
- Czerkies P., Kordalski K., Golas T., Kryszinski D., Luczynski M. (2002) Oxygen requirements of whitefish and vendace (*Coregoninae*) embryos at final stages of their development. *Aquaculture* 211:375-385.



- Dalla Via J., Van Den Thillart G., Cattani O., Cortesi P. (1998) Behavioural responses and biochemical correlates in *Solea solea* to gradual hypoxic exposure. *Canadian Journal of Zoology* 76:2108-2113.
- Dallinger R., Prosi F., Segner H., Back H. (1987) Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research. *Oecologia* 73:91-98.
- Darnat C., Fisson C. (2010) Les PolyChloroBiphényles (PCB) dans le bassin de la Seine et son estuaire. Etude réalisée par le GIP Seine-Aval (Groupement d'Interêt Public):134 p.

- Darias M.J., Lan Chow Wing O., Cahu C., Zambonino-Infante J.L., Mazurais D. (2010) Double staining protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Journal of Applied Ichthyology* 26:280-285. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2010.01421.x.
- Daverat F., Tapie N., Quiniou L., Maury Brachet R., Riso R., Eon M., Laroche J., Budzinski H. (2011) Otolith microchemistry interrogation of comparative contamination by Cd, Cu and PCBs of eel and flounder, in a large SW France catchment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 92:332-338.
- Dawson A. (2008) Control of the annual cycle in birds: Endocrine constraints and plasticity in response to ecological variability. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363:1621-1633. DOI: 10.1098/rstb.2007.0004 10.1098/rstb.2007.2136.
- Delage N., Cachot J., Rochard E., Fraty R., Jatteau P. (2014) Hypoxia tolerance of European sturgeon (*Acipenser sturio* L., 1758) young stages at two temperatures. *Journal of Applied Ichthyology*:n/a-n/a. DOI: 10.1111/jai.12609.
- Delage N., Couturier B., Jatteau P., Cachot J., Rochard E. (2015) Oxythermal window drastically constraints the survival and development of European sturgeon early life stages. *Marine Biology* in press.
- Delage N., Couturier B., Jatteau P., Larcher T., Ledevin M., Goubin H., Cachot J., Rochard E. (submitted) Oxythermal window drastically constraints the survival and development of European sturgeon early life stages. *Journal of Fish Biology* in press.
- Delage N., Morin B., Landi L., Gesset C., Le Barh R., Clérandeau C., Jatteau P., Rochard E., Cachot J. (in press) Embryo-larval assays with European sturgeon and Japanese Medaka to evaluate substratum quality from four sturgeon spawning grounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*.
- Detlaf T.A., Ginzburg T.A., Shmal'gauzen O.I. (1981) Development of sturgeon: egg maturation, fertilization, embryonic and prelarval development. Nauka Publishers, Moscow:224 pp.
- Dettlaff T.A., Ginsburg A.S., Schmalhausen O.I. (1993) (Ed.)^(Eds.) Sturgeon Fishes, Developmental Biology, Aquaculture., Springer Verlag, Berlin. pp. Pages.
- Devlin E.W. (2006) Acute toxicity, uptake and histopathology of aqueous methyl mercury to fathead minnow embryos. *Ecotoxicology* 15:97-110.
- Deycard V.N., Schäfer J., Blanc G., Coynel A., Petit J.C.J., Lanceleur L., Dutruch L., Bossy C., Ventura A. (2014) Contributions and potential impacts of seven priority substances (As, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, and Zn) to a major European Estuary (Gironde Estuary, France) from urban wastewater. *Marine Chemistry* 167:123-134.
- Diaz R.J. (2001) Overview of hypoxia around the world. *Journal of Environmental Quality* 30:275-281.
- Diaz R.J., Rosenberg R. (1995) Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology: an annual review*. Vol. 33:245-303.
- Diaz R.J., Rosenberg R. (2008) Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321:926-929.
- Domenici P., Lefrançois C., Shingles A. (2007) Hypoxia and the antipredator behaviours of fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362:2105-2121.
- Dupont-Prinet A., Vagner M., Chabot D., Audet C. (2013) Impact of hypoxia on the metabolism of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 70:461-469.
- Durrieu G., Maury-Brachet R., Girardin M., Rochard E., Boudou A. (2005) Contamination by heavy metals (Cd, Zn, Cu, and Hg) of eight fish species in the Gironde estuary (France). *Estuaries* 28:581-591.



- EC. (2010) Directive 2010/63/EC of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used in scientific purposes. official Journal of the European Communities L273.
- Elshout P.M.F., Dionisio Pires L.M., Leuven R.S.E.W., Wendelaar Bonga S.E., Hendriks A.J. (2013) Low oxygen tolerance of different life stages of temperate freshwater fish species. *Journal of Fish Biology* 83:190-206.
- Embry M.R., Belanger S.E., Braunbeck T.A., Galay-Burgos M., Halder M., Hinton D.E., Léonard M.A., Lillicrap A., Norberg-King T., Whale G. (2010) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology* 97:79-87. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.12.008.
- Erickson T.R., Stefan H.G. (2000) Linear air/water temperature correlations for streams during open water periods. *Journal of Hydrologic Engineering* 5:317-322. DOI: 10.1061/(asce)1084-0699(2000)5:3(317).
- European Environment Agency. (2012) European waters - current status and future challenges - a synthesis 9.
- EuropeanEnvironmentAgency. (2012) European waters - current status and future challenges - a synthesis 9.



- Faggiano L., de Zwart D., García-Berthou E., Lek S., Gevrey M. (2010) Patterning ecological risk of pesticide contamination at the river basin scale. *Science of the Total Environment* 408:2319-2326.
- Farwell A., Nero V., Croft M., Bal P., Dixon D.G. (2006) Modified Japanese medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51:600-607.
- Fatemeh S., Mohammad P., Abbas E.S., Ali M. (2011) Biochemical Changes after Cadmium Exposure in Persian Sturgeon, *Acipenser persicus* L. *RESEARCH JOURNAL OF CHEMISTRY AND ENVIRONMENT* 15:994-997.
- Feng G., Zhuang P., Zhang L., Duan M. (2012) Effects of temperature on oxydative stress biomarkers in juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) under laboratory conditions. *Advanced Materials Research* 343-344:497-504. DOI: 10.428/www.sceintific.net/AMR.343-344.497.
- Feng L., Zhang L.Z., Zhuang P., Hou J.L., Zhang T., Liu J., Feng G. (2010) Lead accumulation and elimination in juvenile *acipenser sinensis* tissues. *Chinese Journal of Applied Ecology* 21:476-482.
- Fent K., Meier W. (1994) Effects of triphenyltin on fish early life stages. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27:224-231.
- Ferguson D.E., Bingham C.R. (1966) The effects of combinations of insecticides on susceptible and resistant mosquito fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1:97-103.
- Fernandez-Pasquier V. (1999) *Acipenser sturio* L. in the Guadalquivir river, Spain. Water regulation and fishery as factors in stock decline from 1932 to 1967. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* 15:133-135.
- Fernandez-Pasquier V. (2000) Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 in the Guadalquivir River, Spain: A further contribution to its recent population dynamics and present decline. *Boletin - Instituto Espanol de Oceanografia* 16:109-116.
- Ferradou Fine B. (2013) Global warming in the archives of the French water agencies. Contribution to the Adour-Garonne basin (1967-2012). *Gazette des Archives* 230:163-185.

- Ficke A., Myrick C., Hansen L. (2007) Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 17:581-613.
- Filizadeh Y., Rajabi Islami H. (2011) Toxicity determination of three sturgeon species exposed to glyphosate. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 10:383-392.
- Fogels A., Sprague J.B. (1977) Comparative short-term tolerance of zebrafish, flagfish, and rainbow trout to five poisons including potential reference toxicants. *Water Research* 11:811-817.
- Frenzilli G., Nigro M., Lyons B.P. (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 681:80-92.
- Freour P., Cazaux P., Serise M., Coudray P., Thobie A. (1960) The Garonne river at the point Grave in the town La Reole. (Contribution to the study of its pollution). *Journal de médecine de Bordeaux et du Sud-Ouest* 137:881-904.
- Fry F.E.J. (1971) *Fish physiology* Academic press, New York.



- Georgakopoulou E., Katharios P., Divanach P., Koumoundouros G. (2010) Effect of temperature on the development of skeletal deformities in Gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 308:13-19.
- Gessner J., Spratte S., Kirschbaum F. (2011) Historic overview on the status of the European Sturgeon (*Acipenser sturio*) and its fishery in the North Sea and its tributaries with a focus on German waters, *Biology and Conservation of the European Sturgeon Acipenser sturio* L. 1758, Springer. pp. 195-219.
- Gessner J., Tautenhahn M., Von Nordheim H., Borchers T. (2010) Plan national d'actions pour la protection et la conservation de l'Esturgeon européen (*Acipenser sturio*), Gesellschaft zur Rettung des Störes *Acipenser sturio* L. , Rostock. pp. 86.
- Giesy J.P., Dobson S., Solomon K.R. (2000) Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167:35-120.
- Gisbert E., Cech Jr J.J., Doroshov S.I. (2002) Routine metabolism of larval green sturgeon (*Acipenser medirostris* Ayres). *Fish Physiology and Biochemistry* 25:195-200.
- Gluszczak L., dos Santos Miron D., Crestani M., Braga da Fonseca M., Araújo Pedron F.d., Duarte M.F., Vieira V.L.P. (2006) Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65:237-241. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.017>.
- Gluszczak L., Loro V.L., Pretto A., Moraes B.S., Raabe A., Duarte M.F., Da Fonseca M.B., De Menezes C.C., De Sousa Valladão D.M. (2011) Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61:624-630. DOI: 10.1007/s00244-011-9652-4.
- Gobas F., Morrison H.A. (2000) Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, Lewis Publishers: Boca Raton, FL. pp. 189-231.
- González-Doncel M., De La Peña E., Barrueco C., Hinton D.E. (2003) Stage sensitivity of medaka (*Oryzias latipes*) eggs and embryos to permethrin. *Aquatic Toxicology* 62:255-268.
- González-Doncel M., González L., Fernández-Torija C., Navas J.M., Tarazona J.V. (2008) Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 87:280-288.
- Goss L.B., Sabourin T.D. (1985) Utilization of alternative species for toxicity testing: An overview. *Journal of Applied Toxicology* 5:193-219.

- Grousset F.E., Jouanneau J.M., Castaing P., Lavaux G., Latouche C. (1999) A 70 year Record of Contamination from Industrial Activity Along the Garonne River and its Tributaries (SW France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 48:401-414. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/ecss.1998.0435>.
- Gutierrez-Rodriguez F. (1962) El esturion del rio Guadalquivir. *Folleto Informativo* 5:58.



- Hardy R.S., Litvak M.K. (2004) Effects of temperature on the early development, growth, and survival of shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, and Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*, yolk-sac larvae. *Environmental Biology of Fishes* 70:145-154.
- Hassell K.L., Coutin P.C., Nuggeoda D. (2008a) Hypoxia, low salinity and lowered temperature reduce embryo survival and hatch rates in black bream *Acanthopagrus butcheri* (Munro, 1949). *Journal of Fish Biology* 72:1623-1636.
- Hassell K.L., Coutin P.C., Nuggeoda D. (2008b) Hypoxia impairs embryo development and survival in black bream (*Acanthopagrus butcheri*). *Marine Pollution Bulletin* 57:302-306.
- Hazel C.R., Meith S.J. (1970) Bioassay of king salmon eggs and sac fry in copper solutions. *California fish and game* 56:3.
- Hedayati A., Jahanbakhshi A. (2013) Hematotoxic effects of direct infusion of crude diesel oil on juvenile great sturgeon *Huso huso*. *Comparative Clinical Pathology* 22:1117-1122.
- Heintz R.A., Short J.W., Rice S.D. (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:494-503.
- Holmstrup M., Bindesbøl A.M., Oostingh G.J., Duschl A., Scheil V., Köhler H.R., Loureiro S., Soares A.M.V.M., Ferreira A.L.G., Kienle C., Gerhardt A., Laskowski R., Kramarz P.E., Bayley M., Svendsen C., Spurgeon D.J. (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Science of the Total Environment* 408:3746-3762. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.10.067.
- Huang S.S.Y., Strathe A.B., Fadel J.G., Lin P., Liu T.Y., Hung S.S.O. (2012) Absorption, distribution, and elimination of graded oral doses of methylmercury in juvenile white sturgeon. *Aquatic Toxicology* 122-123:163-171.
- Hughes L. (2000) Biological consequences of global warming: Is the signal already apparent? *Trends in Ecology and Evolution* 15:56-61.
- Hutchinson G. (1957) Population studies-animal ecology and demography-concluding remarks, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, COLD SPRING HARBOR LAB PRESS 1 BUNGTOWN RD, PLAINVIEW, NY 11724. pp. 415-427.
- Hutchinson G.E. (1991) Population studies: animal ecology and demography. *Bulletin of Mathematical Biology* 53:193-213.
- Hwang P.P. (1987) Tolerance and ultrastructural responses of branchial chloride cells to salinity changes in the euryhaline teleost *Oreochromis mossambicus*. *Marine Biology* 94:643-649. DOI: 10.1007/bf00431411.



- Incardona J.P., Collier T.K., Scholz N.L. (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196:191-205. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2003.11.026>.
- Incardona J.P., Swarts T.L., Edmunds R.C., Linbo T.L., Aquilina-Beck A., Sloan C.A., Gardner L.D., Block B.A., Scholz N.L. (2013) Exxon Valdez to Deepwater Horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. *Aquatic Toxicology* 142-143:303-316.
- IPCC. (2007) Climate change 2007: synthesis report. Contribution of working groups I, II and III to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva, Switzerland.
- IPCC. (2013) Climate change 2013 The physical science basis Summary for policymakers.
- Ishibashi Y., Inoue K., Nakatsukasa H., Ishitani Y., Miyashita S., Murata O. (2005) Ontogeny of tolerance to hypoxia and oxygen consumption of larval and juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 244:331-340.
- Ismail A., Yusof S. (2011) Effect of mercury and cadmium on early life stages of Java medaka (*Oryzias latipes*): A potential tropical test fish. *Marine Pollution Bulletin* 63:347-349.
- Issartel J., Hervant F., Voituron Y., Renault D., Vernon P. (2005) Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigeal and hypogean crustaceans to different temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 141:1-7. DOI: 10.1016/j.cbpa.2005.02.013.
- IUCN. (2006) 2006 IUCN red list of threatened species.
- Iwamatsu T. (2004) Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of development* 121:605-618.



- Jager T., Zimmer E.I. (2012) Simplified Dynamic Energy Budget model for analysing ecotoxicity data. *Ecological Modelling* 225:74-81. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2011.11.012>.
- Jager T., Heugens E.H.W., Kooijman S.A.L.M. (2006) Making sense of ecotoxicological test results: Towards application of process-based models. *Ecotoxicology* 15:305-314. DOI: 10.1007/s10646-006-0060-x.
- Jager T., Barsi A., Hamda N.T., Martin B.T., Zimmer E.I., Ducrot V. (2014) Dynamic energy budgets in population ecotoxicology: Applications and outlook. *Ecological Modelling* 280:140-147. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2013.06.024.
- Jahanbakhshi A., Hedayati A. (2013) The effect of water-soluble fraction of crude oil on serum biochemical changes in the great sturgeon *Huso huso*. *Comparative Clinical Pathology* 22:1099-1102.
- Jatteau P., Drouineau H., Charles K., Carry L., Lambert P. (submitted) Testing and modelling thermal tolerance of allis shad embryo and larvae (*Alosa alosa*) - consequences on survival rate and application to the Garonne River population in the context of global warming. *Journal of freshwater biology*.
- Jego S., Gazeau C., Jatteau P., Elie P., Rochard E. (2002) Spawning grounds available for the European sturgeon *Acipenser sturio* L. 1758 in the Garonne-Dordogne Basin. Methods used, present status and prospects. Les frayères potentielles de l'esturgeon Européen *Acipenser sturio* L. 1758 dans le Bassin Garonne-Dordogne. Méthodes d'investigation, état actuel et perspectives:487-505.
- Jego S., Gazeau C., Rochard E., Elie P., Puivif P.-A., Viry B. (1997) Opération II : Etat des frayères et propositions de restauration et protection. Rapport final Life Sturio Operation II.
- Jezierska B., Ługowska K., Witeska M. (2009) The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiology and Biochemistry* 35:625-640.

- Johnson S.C., Chapman G.A., Stevens D.G. (1989) Relationships between temperature units and sensitivity to handling for coho salmon and rainbow trout embryos. *The Progressive Fish-Culturist* 51:61-68.
- Johnston E.F., Alderman S.L., Gillis T.E. (2013) Chronic hypoxia exposure of trout embryos alters swimming performance and cardiac gene expression in larvae. *Physiological and Biochemical Zoology* 86:567-575.
- Johnston I.A., Lee H.T., Macqueen D.J., Paranthaman K., Kawashima C., Anwar A., Kinghorn J.R., Dalmay T. (2009) Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: Genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes. *Journal of Experimental Biology* 212:1781-1793.
- Jurss K., Bastrop R. (1995) The function of mitochondria-rich cells (chloride cells) in teleost gills. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5:235-255.



- Kammann U., Biselli S., Hühnerfuss H., Reineke N., Theobald N., Vobach M., Wosniok W. (2004) Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environmental Pollution* 132:279-287.
- Kappenman K.M., Webb M.A.H., Greenwood M. (2013) The effect of temperature on embryo survival and development in pallid sturgeon *Scaphirhynchus albus* (Forbes & Richardson 1905) and shovelnose sturgeon *S. platyrhynchus* (Rafinesque, 1820). *Journal of Applied Ichthyology*.
- Kappenman K.M., Fraser W.C., Toner M., Dean J., Webb M.A.H. (2009) Effect of temperature on growth, condition, and survival of juvenile shovelnose sturgeon. *Transactions of the American Fisheries Society* 138:927-937.
- Kaur K., Bajwa K. (1987) Effect of zinc and cadmium on early life stages of common carp, *Cyprinus carpio* Linn. *Annals of Biology* 3:28-33.
- Khakimullin A.A. (1987) Oxygen preferendum (preferred oxygen regime) of hatchery young of the Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*. *Journal of Ichthyology* 27:111-115.
- Kieffer J.D., Baker D.W., Wood A.M., Papadopoulos C.N. (2011) The effects of temperature on the physiological response to low oxygen in Atlantic sturgeon. *Fish Physiology and Biochemistry* 37:809-819. DOI: DOI 10.1007/s10695-011-9479-y.
- Kieffer M.C., Kynard B. (1996) Spawning of the shortnose sturgeon in the Merrimack River, Massachusetts. *Transactions of the American Fisheries Society* 125:179-186.
- Killen S.S., Marras S., Metcalfe N.B., McKenzie D.J., Domenici P. (2013) Environmental stressors alter relationships between physiology and behaviour. *Trends in Ecology and Evolution* 28:651-658.
- Kirschbaum F., Williot P., Fredrich F., Tiedemann R., Gessner J. (2011) Restoration of the European sturgeon *Acipenser sturio* in Germany, *Biology and Conservation of the European Sturgeon Acipenser sturio* L. 1758, Springer. pp. 309-333.
- Kolman R. (2011) European sturgeon, *Acipenser sturio* in Georgia, *Biology and Conservation of the European Sturgeon Acipenser sturio* L. 1758, Springer. pp. 243-250.
- Kolman R., Zarkua Z. (2000) Jesiotr kolchidzki [*Acipenser persicum colchicus* Marti] rzeki Rioni. *Komunikaty Rybackie* 6:2-3.
- Kolman R., Kapusta A., Morzuch J. (2011) History of the sturgeon in the Baltic Sea and Lake Ladoga, *Biology and Conservation of the European Sturgeon Acipenser sturio* L. 1758, Springer. pp. 221-226.
- Kraepiel A.M.L., Chiffoleau J.F., Martin J.M., Morel F.M.M. (1997) Geochemistry of trace metals in the Gironde estuary. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61:1421-1436.

- Kumaravel T., Vilhar B., Faux S., Jha A. (2009) Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25:53-64. DOI: 10.1007/s10565-007-9043-9.
- Kümmerer K. (2009) The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management* 90:2354-2366.



- Laetz C.A., Baldwin D.H., Hebert V.R., Stark J.D., Scholz N.L. (2014) Elevated temperatures increase the toxicity of pesticide mixtures to juvenile coho salmon. *Aquatic Toxicology* 146:38-44. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.10.022.
- Lammer E., Carr G.J., Wendler K., Rawlings J.M., Belanger S.E., Braunbeck T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 149:13.
- Lanceleur L., Schäfer J., Bossy C., Coynel A., Larrose A., Masson M., Blanc G. (2011) Silver fluxes to the Gironde Estuary - Eleven years (1999-2009) of monitoring at the watershed scale. *Applied Geochemistry* 26:797-808. DOI: 10.1016/j.apgeochem.2011.02.001.
- Lanoux A., Etcheber H., Schmidt S., Sottolichio A., Chabaud G., Richard M., Abril G. (2013) Factors contributing to hypoxia in a highly turbid, macrotidal estuary (the Gironde, France). *Environmental Sciences: Processes and Impacts* 15:585-595.
- Laporte E. (1853) Faune ichthyologique du département de la Gironde. *Actes de la Société Linnéenne de Bordeaux* 19:153-224.
- Lassalle G., Rochard E. (2009) Impact of twenty-first century climate change on diadromous fish spread over Europe, North Africa and the Middle East. *Global Change Biology* 15:1072-1089.
- Lassalle G., Crouzet P., Gessner J., Rochard E. (2010a) Global warming impacts and conservation responses for the critically endangered European Atlantic sturgeon. *Biol Conserv* 143:2441-2452.
- Lassalle G., Crouzet P., Gessner J., Rochard E. (2010b) Global warming impacts and conservation responses for the critically endangered European Atlantic sturgeon. *Biological Conservation* 143:2441-2452.
- Le Bihanic F., Morin B., Cousin X., Le Menach K., Budzinski H., Cachot J. (2014a) Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout. *Environmental Science and Pollution Research* 21:13720-13731.
- Le Bihanic F., Clérandeau C., Le Menach K., Morin B., Budzinski H., Cousin X., Cachot J. (2014b) Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part II: adverse effects in Japanese medaka. *Environmental Science and Pollution Research* 21:13732-13743.
- Le Bihanic F., Perrichon P., Landi L., Clérandeau C., Le Menach K., Budzinski H., Cousin X., Cachot J. (2014c) Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. *Environmental Science and Pollution Research*:1-14.
- Le Bihanic F., Somnard V., Perrine D.L., Pichon A., Grasset J., Berrada S., Budzinski H., Cousin X., Morin B., Cachot J. (2015) Environmental concentrations of benz[a]anthracene induce developmental defects and DNA damage and impair photomotor response in Japanese medaka larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113:321-328.
- Lecointre G., Guyader H.L., Visset D. (2001) Classification phylogénétique du vivant Belin.
- Lefrançois C., Domenici P. (2006) Locomotor kinematics and behaviour in the escape response of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., exposed to hypoxia. *Marine Biology* 149:969-977.
- Lepage M., Rochard E. (1995) Threatened fishes of the world: *Acipenser sturio* Linnaeus, 1758 (*Acipenseridae*). *Environmental Biology of Fishes* 43:28-28.

- Lepage M., Rochard E. (2011) Chapter 22 Fishery by-catch of European sturgeon in the Bay of Biscay in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* L., 1758, Springer. pp. 335-342.
- Lepage M., Rochard E., Castelnaud G. (2000a) Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 restoration and gravel extraction in the Gironde estuary. *BOLETIN-INSTITUTO ESPANOL DE OCEANOGRAFIA* 16:175-180.
- Lepage M., Rochard E., Castelnaud G. (2000b) Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 restoration and gravel extraction in the Gironde estuary. *Boletin - Instituto Espanol de Oceanografia* 16:175-179.
- Lepage M., Taverny C., Piefort S., Dumont P., Rochard E., Brosse L. (2005) Juvenile sturgeon (*Acipenser sturio*) habitat utilization in the Gironde estuary as determined by acoustic telemetry., in: M. T. Spedicato, et al. (Eds.), *Aquatic telemetry: advances and applications*., FAO - COISPA., Rome. pp. 169-177.
- Lespes G., Bancon-Montigny C., Aguerre S., Potin-Gautier M. (2005) Organotin speciation in waters and sediments in the Adour-Garonne basin. *Spéciation des organoétains dans les eaux et sédiments du bassin Adour-Garonne* 18:47-63.
- Linares-Casenave J., Werner I., Van Eenennaam J.P., Doroshov S.I. (2013) Temperature stress induces notochord abnormalities and heat shock proteins expression in larval green sturgeon (*Acipenser medirostris* Ayres 1854). *Journal of Applied Ichthyology* 29:958-967.
- Little E.E., Calfee R.D., Linder G. (2012) Toxicity of Copper to Early-life Stage Kootenai River White Sturgeon, Columbia River White Sturgeon, and Rainbow Trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*:1-9.
- Lo K.H., Hui M.N.Y., Yu R.M.K., Wu R.S.S., Cheng S.H. (2011) Hypoxia Impairs Primordial Germ Cell Migration in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Plos One* 6. DOI: e2454010.1371/journal.pone.0024540.
- Lorenzo Y., Costa S., Collins A.R., Azqueta A. (2013) The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*:get018.



- MAGEST. (2011) <http://www.magest.u-bordeaux1.fr>.
- Magnin E. (1959) Répartition actuelle des Acipensérédés. ***Rev. Trav. Inst. Pêches marit.* 23:277-285.
- Magnin E. (1962) Recherches sur la systématique et la biologie des Acipensérédés. *Annales de la Station Centrale d'Hydrobiologie Appliquée* 9:7-242.
- Mai H., Morin B., Pardon P., Gonzalez P., Budzinski H., Cachot J. (2013) Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research* 89:1-8.
- Mai H., Cachot J., Brune J., Geffard O., Belles A., Budzinski H., Morin B. (2012) Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Pollution Bulletin* 64:2663-2670.
- Mai H., Gonzalez P., Pardon P., Tapie N., Budzinski H., Cachot J., Morin B. (2014) Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. *Aquatic Toxicology* 147:48-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.024>.
- Mashroofeh A., Bakhtiari A.R., Pourkazemi M. (2012) Bioaccumulation of Zn, Cu and Mn in the caviar and muscle of persian sturgeon (*Acipenser persicus*) from the Caspian Sea, Iran. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 89:1201-1204.

- Mashroofeh A., Bakhtiari A.R., Pourkazemi M., Rasouli S. (2013) Bioaccumulation of Cd, Pb and Zn in the edible and inedible tissues of three sturgeon species in the Iranian coastline of the Caspian Sea. *Chemosphere* 90:573-580.
- Masson M., Schäfer J., Blanc G., Dabrin A., Castelle S., Lavaux G. (2009) Behavior of arsenic and antimony in the surface freshwater reaches of a highly turbid estuary, the Gironde Estuary, France. *Applied Geochemistry* 24:1747-1756.
- Maury-Brachet R., Rochard E., Durrieu G., Boudou A. (2008) The 'Storm of the Century' (December 1999) and the accidental escape of Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*) into the Gironde estuary (Southwest France): An original approach for metal contamination. *Environmental Science and Pollution Research* 15:89-94.
- Maxime V., Nonnotte G., Peyraud C., Williot P., Truchot J.P. (1995) Circulatory and respiratory effects of an hypoxic stress in the Siberian sturgeon. *Respiration Physiology* 100:203-212. DOI: 10.1016/0034-5687(95)00003-v.
- Mayfield R.B., Cech J.J. (2004) Temperature effects on green sturgeon bioenergetics. *Transactions of the American Fisheries Society* 133:961-970.
- McDowall R.M. (1997) The evolution of diadromy in fishes (revisited) and its place in phylogenetic analysis. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7:443-462.
- McInerny G.J., Etienne R.S. (2013) 'Niche' or 'distribution' modelling? A response to Warren. *Trends in ecology & evolution* 28:191-192.
- McKenzie D.J., Steffensen J.F., Korsmeyer K., Whiteley N.M., Bronzi P., Taylor E.W. (2007) Swimming alters responses to hypoxia in the Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*. *Journal of Fish Biology* 70:651-658. DOI: 10.1111/1095-8649.2007.01337.x.
- McKim J.M., Christensen G.M., Tucker J.H. (1974) Effects of pollution on freshwater fish. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 46:1540-1591.
- Mejri S., Tremblay R., Lambert Y., Audet C. (2012) Influence of different levels of dissolved oxygen on the success of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) egg hatching and embryonic development. *Marine Biology* 159:1693-1701.
- Melzner F., Bock C., Portner H.O. (2006) Temperature-dependent oxygen extraction from the ventilatory current and the costs of ventilation in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Journal of Comparative Physiology B* 176:607-621. DOI: 10.1007/s00360-006-0084-9.
- Mhadhbi L., Beiras R. (2012) Acute toxicity of seven selected pesticides (alachlor, atrazine, dieldrin, diuron, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, diazinon) to the marine fish (turbot, *Psetta maxima*). *Water, Air, and Soil Pollution* 223:5917-5930.
- Mikkelsen G.M. (2005) Niche-based vs. neutral models of ecological communities. *Biology and Philosophy* 20:557-566.
- Ministère de l'écologie et du développement durable d.T.e.d.L. (2011) Plan national d'action en faveur de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* 2011-2015, Ministère de l'écologie et du développement durable, Paris.
- Modesto K.A., Martinez C.B.R. (2010) Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78:294-299. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047>.
- Mohseni O., Stefan H.G. (1999) Stream temperature/air temperature relationship: A physical interpretation. *Journal of Hydrology* 218:128-141. DOI: 10.1016/S0022-1694(99)00034-7.
- Morin B., Filatreau J., Vicquelin L., Barjhoux I., Guinel S., Leray-Forget J., Cachot J. (2011) Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399:2235-2242.
- Motelay-Massei A., Ollivon D., Garban B., Tiphagne-Larcher K., Chevreuil M. (2007) Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Seine estuary, France: Mass balance and role of atmospheric deposition. *Hydrobiologia* 588:145-157.

- Mouchet F., Gauthier L., Mailhes C., Jourdain M.J., Ferrier V., Triffault G., Devaux A. (2006) Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox® and Ames tests). *Science of the Total Environment* 355:232-246.
- Mueller C.A., Joss J.M.P., Seymour R.S. (2011a) The energy cost of embryonic development in fishes and amphibians, with emphasis on new data from the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 181:43-52. DOI: 10.1007/s00360-010-0501-y.
- Mueller C.A., Joss J.M.P., Seymour R.S. (2011b) Effects of environmental oxygen on development and respiration of Australian lungfish (*Neoceratodus forsteri*) embryos. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 181:941-952.
- Mustafa S.A., Al-Subiai S.N., Davies S.J., Jha A.N. (2011) Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Ecotoxicology* 20:1455-1466.



- Nagel R. (2001) DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19:38-48.
- Nešković N.K., Poleksić V., Elezović I., Karan V., Budimir M. (1996) Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56:295-302. DOI: 10.1007/s001289900044.
- Nicholson G., Jenkins G.P., Sherwood J., Longmore A. (2008) Physical environmental conditions, spawning and early-life stages of an estuarine fish: Climate change implications for recruitment in intermittently open estuaries. *Marine and Freshwater Research* 59:735-749.
- Niklitschek E.J., Secor D.H. (2005) Modeling spatial and temporal variation of suitable nursery habitats for Atlantic sturgeon in the Chesapeake Bay. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 64:135-148. DOI: 10.1016/j.ecss.2005.02.012.
- Niklitschek E.J., Secor D.H. (2009) Dissolved oxygen, temperature and salinity effects on the ecophysiology and survival of juvenile Atlantic sturgeon in estuarine waters: I. Laboratory results. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 381, Supplement:S150-S160.
- Nimrod A.C., Benson W.H. (1998) Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens. *Aquatic Toxicology* 44:141-156.
- Ninness M.M., Stevens E.D., Wright P.A. (2006) Energy expenditure during hatching in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63:1405-1413.
- Ninua N.S. (1976) Caractéristiques de l'alimentation des jeunes esturgeons *, Tbilisi.
- Nonnotte G., Maxime V., Truchot J.P., Williot P., Peyraud C. (1993) Respiratory responses to progressive ambient hypoxia in the sturgeon, *Acipenser baeri*. *Respiration Physiology* 91:71-82.



- OECD. (1998) Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France:20.

Osterauer R., Köhler H.R. (2008) Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 86:485-494.



Padilla S., Cowden J., Hinton D.E., Yuen B., Law S., Kullman S.W., Johnson R., Hardman R.C., Flynn K., Au D.W.T. (2009) Use of Medaka in toxicity testing. *Current Protocols in Toxicology*:1.10.1-1.10.36.

Pages M., Desse-Berset N., Tougaard C., Brosse L., Hänni C., Berrebi P. (2008) Historical presence of the sturgeon *Acipenser sturio* in the Rhône basin determined by the analysis of ancient DNA cytochrome b sequences. *Conservation Genetics* 10:217-224. DOI: DOI 10.1007/s10592-008-9549-6.

Pankhurst N.W., Munday P.L. (2011) Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages. *Marine and Freshwater Research* 62:1015-1026. DOI: 10.1071/mf10269.

Park C., Lee S.Y., Kim D.S., Nam Y.K. (2013) Effects of incubation temperature on egg development, hatching and pigment plug evacuation in farmed Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. *Fisheries and Aquatic Science* 16:25-34.

Peng H., Zhang K., Wan Y., Hu J. (2012) Tissue distribution, maternal transfer, and age-related accumulation of dechloranes in Chinese sturgeon. *Environmental Science and Technology* 46:9907-9913.

Perrichon P., Le Bihanic F., Bustamante P., Le Menach K., Budzinski H., Cachot J., Cousin X. (2014) Influence of sediment composition on PAH toxicity using zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryo-larval assays. *Environmental Science and Pollution Research*.

Petit J.C.J., Schäfer J., Coynel A., Blanc G., Deycard V.N., Derriennic H., Lanceleur L., Dutruch L., Bossy C., Mattielli N. (2013) Anthropogenic sources and biogeochemical reactivity of particulate and dissolved Cu isotopes in the turbidity gradient of the Garonne River (France). *Chemical Geology* 359:125-135.

Plaut I. (2001) Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 131:41-50.

Podushka S. (1999) Poimka atlanticheskogo osetra *Acipenser sturio* v Ladozhskom ozere. *Izd INENKO, St. Petersburg*:5-10.

Pörtner H. (2001) Climate change and temperature-dependent biogeography: Oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften* 88:137-146.

Pronier O., Rochard E. (1998) Fonctionnement d'une population d'éperlan (*Osmerus eperlanus*, osmériiformes osmeridae) située en limite méridionale de son aire de répartition, influence de la température. *Bulletin Français De La Pêche Et De La Pisciculture* 71:479-497.



Rabalais N.N., Díaz R.J., Levin L.A., Turner R.E., Gilbert D., Zhang J. (2010) Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. *Biogeosciences* 7:585-619.

Ramade F. (2007) Introduction à l'écotoxicologie: Fondements et applications Lavoisier.

Randall D.J., McKenzie D.J., Abrami G., Bondiolotti G.P., Natiello F., Bolis L., Agradi E. (1992) Effect of diet on response to hypoxia in sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Journal of Experimental Biology* 170:113-125.

- Richards J.G. (2011) Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *Journal of Experimental Biology* 214:191-199.
- Robinet T.T., Feunteun E.E. (2002) Sublethal effects of exposure to chemical compounds: a cause for the decline in Atlantic eels? *Ecotoxicology* 11:265-277.
- Rochard E. (2011) Chapter 18 Present legal status of the European sturgeon *Acipenser sturio*, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio L., 1758*, Springer. pp. 251-256.
- Rochard E., Castelnaud G., Lepage M. (1990) Sturgeons (Pisces: Acipenseridae); threats and prospects. *J Fish Biol* 37:123-132.
- Rochard E., Lepage M., Meauze L. (1997) Identification et caractérisation de l'aire de répartition marine de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* à partir de déclarations de captures. *Aquatic Living Resources* 10:101-109.
- Rochard E., Williot P., Castelnaud G., Lepage M. (1991) Eléments de systématique et de biologie des populations sauvages d'esturgeons, in: P. Williot (Ed.), *Premier colloque international sur l'esturgeon*, CEMAGREF, Antony., Bordeaux. pp. 475-507.
- Rochard E., Lepage M., Dumont P., Tremblay S., Gazeau C. (2001) Downstream migration of juvenile European sturgeon *Acipenser sturio* L. in the Gironde estuary. *Estuaries* 24:108-115.
- Roessig J.M., Woodley C.M., Cech Jr J.J., Hansen L.J. (2004) Effects of global climate change on marine and estuarine fishes and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14:251-275.
- Rombough P.J. (1988a) Growth, aerobic metabolism, and dissolved-oxygen requirements of embryos and alevins of steelhead, *Salmo gairdneri*. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 66:651-660. DOI: 10.1139/z88-097.
- Rombough P.J. (1988b) 2 Respiratory Gas Exchange, Aerobic Metabolism, and Effects of Hypoxia During Early Life. *Fish physiology* 11:59-161.
- Rosenthal H., Bronzi P., Gessner J., Moreau D., Rochard E., Lasen C. (2007) Draft action plan for the conservation and restoration of the European sturgeon (*Acipenser sturio*), Council of Europe, Convention on the conservation of European wildlife and natural habitats, Strasbourg. pp. 47.
- Rouault T., Chèvre P., Rochard E., Jatteau P., Jacobs L., Gonthier P. (2008) Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* ; bilan scientifique et technique 2007. Cemagref de Bordeaux étude n°127:79p.
- Rougier T., Lambert P., Drouineau H., Girardin M., Castelnaud G., Carry L., Aprahamian M., Rivot E., Rochard E. (2012) Collapse of allis shad, *Alosa alosa*, in the Gironde system (southwest France): Environmental change, fishing mortality, or Allee effect? *ICES Journal of Marine Science* 69:1802-1811.
- Roule L. (1922) Etude sur l'esturgeon du Golfe de Gascogne et du bassin girondin. Notes et mémoires 20.
- Ruer P.M., Cech Jr J.J., Doroshov S.I. (1987) Routine metabolism of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: Effect of population density and hypoxia. *Aquaculture* 62:45-52. DOI: 10.1016/0044-8486(87)90183-9.



- Sardella B.A., Sanmarti E., Kultz D. (2008) The acute temperature tolerance of green sturgeon (*Acipenser medirostris*) and the effect of environmental salinity. *Journal of Experimental Zoology Part A-Ecological Genetics and Physiology* 309A:477-483. DOI: 10.1002/jez.477.
- Saunders R.L., Sprague J.B. (1967) Effects of copper-zinc mining pollution on a spawning migration of Atlantic salmon. *Water Research* 1:419-432.

- Sauquet E., Catalogne C. (2011) Comparison of catchment grouping methods for flow duration curve estimation at ungauged sites in France. *Hydrology and Earth System Sciences* 15:2421-2435.
- Schlenger A.J., North E.W., Schlag Z., Li Y., Secor D.H., Smith K.A., Niklitschek E.J. (2013) Modeling the influence of hypoxia on the potential habitat of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus*: A comparison of two methods. *Marine Ecology Progress Series* 483:257-272.
- Secor D.H., Gunderson T.E. (1998a) Effects of hypoxia and temperature on survival, growth and respiration of juvenile Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*. *Fishery Bulletin* 96:603-613.
- Secor D.H., Gunderson T.E. (1998b) Effects of hypoxia and temperature on survival, growth, and respiration of juvenile Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*. *Fishery Bulletin* 96:603-613.
- Shaner D.L., Brunk G., Belles D., Westra P., Nissen S. (2006) Soil dissipation and biological activity of metolachlor and S-metolachlor in five soils. *Pest Management Science* 62:617-623.
- Shang E.H.H., Wu R.S.S. (2004) Aquatic hypoxia is a teratogen and affects fish embryonic development. *Environmental Science and Technology* 38:4763-4767.
- Shazili N.A., Pascoe D. (1986) Variable sensitivity of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and alevins to heavy metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 36:468-474.
- Shen J., Zhang Q., Ding S., Zhang S., Coats J.R. (2005) Bioconcentration and elimination of avermectin B1 in sturgeon. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:396-399.
- Shinn C., Dauba F., Grenouillet G., Guenard G., Lek S. (2009) Temporal variation of heavy metal contamination in fish of the river lot in southern France. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:1957-1965.
- Silvestre F., Linares-Casenave J., Doroshov S.I., Kültz D. (2010) A proteomic analysis of green and white sturgeon larvae exposed to heat stress and selenium. *Science of the Total Environment* 408:3176-3188.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175:184-191.
- Sinkkonen S., Paasivirta J. (2000) Degradation half-life times of PCDDs, PCDFs and PCBs for environmental fate modeling. *Chemosphere* 40:943-949. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00337-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00337-9).
- Şişman T., Geyikoğlu F., Atamanalp M. (2007) Early life-stage toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) following embryonal exposure to selected polychlorinated biphenyls. *Toxicology and Industrial Health* 23:529-536.
- Skinner L., De Peyster A., Schiff K. (1999) Developmental effects of urban storm water in medaka (*Oryzias latipes*) and inland silverside (*Menidia beryllina*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37:227-235.
- Sloman K.A., McNeil P.L. (2012) Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. *Journal of Fish Biology* 81:2175-2198.
- Soffientino B., Nacci D.E., Specker J.L. (2010a) Effects of the dioxin-like PCB 126 on larval summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 152:9-17.
- Soffientino B., Nacci D.E., Specker J.L. (2010b) Effects of the dioxin-like PCB 126 on larval summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 152:9-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.02.006>.
- Sottolichio A., Castaing P. (1999) A synthesis on seasonal dynamics of highly-concentrated structures in the Gironde estuary. *Comptes Rendus de l'Academie de Sciences - Serie IIa: Sciences de la Terre et des Planetes* 329:795-800.
- Sottolichio A., Hanquiez V., Périnotto H., Sabouraud L., Weber O. (2013) Evaluation of the recent morphological evolution of the Gironde estuary through the use of some preliminary synthetic indicators. *Journal of Coastal Research*:1224-1229.

- Spitsbergen J.M., Tsai H.W., Reddy A., Miller T., Arbogast D., Hendricks J.D., Bailey G.S. (2000) Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by two exposure routes at different developmental stages. *Toxicologic Pathology* 28:705-715.
- Stahl K., Hisdal H., Hannaford J., Tallaksen L.M., Van Lanen H.A.J., Sauquet E., Demuth S., Fendekova M., Jodar J. (2010) Streamflow trends in Europe: Evidence from a dataset of near-natural catchments. *Hydrology and Earth System Sciences* 14:2367-2382.



- Tapie N., Menach K.L., Pasquaud S., Elie P., Devier M.H., Budzinski H. (2011) PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere* 83:175-185.
- Taverny C., Lepage M., Piefort S., Dumont P., Rochard E. (2002) Habitat selection by juvenile European sturgeon *Acipenser sturio* in the Gironde estuary (France). *J Appl Ichthyol* 18:536-541.
- Tompsett A.R., Vardy D.W., Higley E., Doering J.A., Allan M., Liber K., Giesy J.P., Hecker M. (2014) Effects of Columbia River water on early life-stages of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 101:23-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.12.004>.
- Topal A., Atamanalp M., Uçar A., Oruç E., Kocaman E.M., Sulukan E., Akdemir F., Beydemir S., Kiliç N., Erdoğan O., Ceyhan S.B. (2015) Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 111:206-214. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.027.
- Travade F., Carry L. (2008) Effet de la canicule de 2003 sur les poissons migrateurs en Garonne et dordogne - réflexions sur les effets des rejets thermiques de la centrale nucléaire de Golfech sur la Garonne. *Hydroécologie Appliquée* 16:169-189.



- van den Brandhof E.J., Montforts M. (2010) Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73:1862-1866.
- Vaquier-Sunyer R., Duarte C.M. (2011) Temperature effects on oxygen thresholds for hypoxia in marine benthic organisms. *Global Change Biology* 17:1788-1797. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2010.02343.x.
- Vardy D.W., Santore R., Ryan A., Giesy J.P., Hecker M. (2014) Acute toxicity of copper, lead, cadmium, and zinc to early life stages of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in laboratory and Columbia River water. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI: 10.1007/s11356-014-2754-6.
- Vardy D.W., Oellers J., Doering J.A., Hollert H., Giesy J.P., Hecker M. (2013) Sensitivity of early life stages of white sturgeon, rainbow trout, and fathead minnow to copper. *Ecotoxicology* 22:139-147.
- Velez Soto F. (1951) Observations sur la pêche de l'esturgeon *Acipenser sturio* L. dans le Guadalquivir durant l'année 1950. *Bulletin Français de la Pisciculture* 163:50-56.
- Verma S., Rani S., Dalela R. (1981) Synergism, antagonism, and additivity of phenol, pentachlorophenol, and dinitrophenol to a fish (*Notopterus notopterus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 10:365-370.

Vicquelin L., Leray-Forget J., Peluhet L., LeMenach K., Deflandre B., Anschutz P., Etcheber H., Morin B., Budzinski H., Cachot J. (2011) A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquatic Toxicology* 105:235-245. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.06.011.



- Wang Y.L., Binkowski F.P., Doroshov S.I. (1985) Effect of temperature on early development of white and lake sturgeon, *Acipenser transmontanus* and *A. fulvescens*. *Environmental Biology of Fishes* 14:43-50.
- Warren D.L. (2012) In defense of 'niche modeling'. *Trends in ecology & evolution* 27:497-500.
- Warren D.L. (2013) 'Niche modeling': that uncomfortable sensation means it's working. A reply to McInerney and Etienne. *Trends in ecology & evolution* 28:193-194.
- Webster T.M.U., Santos E.M. (2015) Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *Bmc Genomics* 16. DOI: 10.1186/s12864-015-1254-5.
- Werner I., Linares-Casenave J., Van Eenennaam J.P., Doroshov S.I. (2007) The effect of temperature stress on development and heat-shock protein expression in larval green sturgeon (*Acipenser mirostris*). *Environmental Biology of Fishes* 79:191-200.
- Williot P., Chèvre P. (2011) Chapter 32 Reproduction of the cultured brood fish, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio L., 1758*, Springer. pp. 439-448.
- Williot P., Castelnaud G. (2011) Chapter 20 Historic overview of the European sturgeon *Acipenser sturio* in France: surveys, regulations, reasons for the decline, conservation, and analysis, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio L., 1758*, Springer. pp. 285-308.
- Williot P., Rouault T., Brun R., Gessner J. (2011a) Chapter 12 Characteristics of the reproductive cycle of wild *Acipenser sturio*, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio L., 1758*, Springer. pp. 165-175.
- Williot P., Rouault T., Brun R., Pelard M., Mercier D. (2002) Status of caught wild spawners and propagation of the endangered sturgeon *Acipenser sturio* in France: a synthesis. *International Review of Hydrobiology* 87:515-524.
- Williot P., Rouault T., Pelard M., Mercier D., Jacobs L. (2009) Artificial reproduction and larval rearing of captive endangered Atlantic sturgeon *Acipenser sturio*. *Endangered Species Research* 6:251-257.
- Williot P., Rochard E., Desse-Berset N., Gessner J., Kirschbaum F. (2011b) Chapter 1 Brief introduction to sturgeon with a special focus on the European sturgeon, *Acipenser sturio* L. 1758, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio L., 1758*, Springer. pp. 3-12.
- Williot P., Rochard E., Castelnaud G., Rouault T., Brun R., Lepage M., Elie P. (1997) Biological characteristics of European Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio*, as the basis for a restoration program in France. *Environmental Biology of Fishes* 48:359-370. DOI: 10.1023/a:1007392904240.
- Williot P., Rouault T., Brun J.R., Pelard M., Mercier D., Jacobs L., Kirschbaum F. (2011c) Chapter 31 Building a brood stock of *Acipenser sturio* in France, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio L., 1758*, Springer. pp. 425-438.
- Wittbrodt J., Shima A., Schartl M. (2002) Medaka - A model organism from the Far East. *Nature Reviews Genetics* 3:53-64.

- Wolf M.C., Moore P.A. (2002) Effects of the herbicide metolachlor on the perception of chemical stimuli by *Orconectes rusticus*. *Journal of the North American Benthological Society* 21:457-467.
- Woodland R.J., Secor D.H., Niklitschek E.J. (2009) Past and Future Habitat Suitability for the Hudson River Population of Shortnose Sturgeon: A Bioenergetic Approach to Modeling Habitat Suitability for an Endangered Species. *Challenges for Diadromous Fishes in a Dynamic Global Environment* 69:589-604.
- Wu R.S.S. (2002) Hypoxia: From molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin* 45:35-45.
- Wuertz S., Reiser S., Gessner J., Kirschbaum F. (2011) Chapter 4 Morphological distinction between juvenile stages of the European sturgeon *Acipenser sturio* and the Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus*, in: P. Williot, et al. (Eds.), *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio L., 1758*, Springer. pp. 53-64.



- Zhang H., Cao H., Meng Y., Jin G., Zhu M. (2012) The toxicity of cadmium (Cd 2+) towards embryos and pro-larva of soldatov's catfish (*Silurus soldatovi*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80:258-265. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.03.013.
- Zhang L.z., Yao Z.f., Zhuang P., Huang X.r., Zhao F., Wang Y. (2011) Effects of dissolved copper in water body on serum biochemical indices of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Chinese Journal of Ecology* 30:2516-2522.
- Zhang Y., Kieffer J.D. (2014) Critical thermal maximum (CTmax) and hematology of shortnose sturgeons (*Acipenser brevirostrum*) acclimated to three temperatures. *Canadian Journal of Zoology* 92:215-221. DOI: 10.1139/cjz-2013-0223.
- Ziegeweid J.R., Jennings C.A., Peterson D.L. (2008) Thermal maxima for juvenile shortnose sturgeon acclimated to different temperatures. *Environmental Biology of Fishes* 82:299-307. DOI: 10.1007/s10641-007-9292-8.

TABLES DES ILLUSTRATIONS

I. Figures

- Figure 1 :** Développement embryo-larvaire de l'esturgeon européen à 4 heures post fécondation (hpf) stade 4 cellules (A), 80 hpf stade oeillé (B), 1 jour post éclosion (dph) (C), 8 dph (D), 1 an (E) et adulte mature (F).22
- Figure 2 :** Evolution des captures d'esturgeons et de la production de caviar dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne au cours du 20ème siècle (Castelnaud, 2011).24
- Figure 3 :** Distribution continentale de l'esturgeon européen vers 1750-1850 (Lassalle et al., 2010b). La distinction est faite entre trois groupes fonctionnels des bassins versants. Les captures côtières sont rapportées aux marges extrêmes de l'aire de distribution de l'esturgeon européen par les bandes noires. Le bassin versant du Nil est tronqué afin de permettre une vision plus claire des autres bassins versants. Les numéros 1 à 24 correspondent aux différents bassins versant dans lesquels l'esturgeon européen a été présent classés par ordre alphabétique.....26
- Figure 4 :** Probabilité que les différents bassins versants présentent les conditions nécessaires pour accueillir une reproduction d'esturgeon européen selon les scenarii A2 et A1FI pour 2050 et 2100 d'après Lassalle et al. (2010b).28
- Figure 5 :** Distribution globale des zones mortes rapportées par des études scientifiques (Diaz and Rosenberg, 2008).32
- Figure 6 :** Proportion des plans d'eau classés en différents bassins versants touchés par les pressions de pollution, pour (a) les rivières et les lacs et (b) les eaux côtières et de transition (EuropeanEnvironmentAgency, 2012).34
- Figure 7 :** Transformateur électrique contenant un mélange de PCBs (pyralène) situé sur la Dordogne au barrage de Bergerac.42
- Figure 8 :** Localisation de la zone d'étude. Les frayères en zone de marée dynamique sont symbolisées par des étoiles blanches. Les étoiles bleues symbolisent les frayères non influencées par les marées. Les points bleus localisent les lieux de relevés de température et d'oxygène.48
- Figure 9 :** Dispersion des températures moyennes journalières (gauche) et des saturations moyennes en oxygène (droite) sur les sites de relevés. Les températures (en moyenne journalière) médianes, premier et troisième quartile ainsi que minimales et maximales sont représentées sur ce schéma.49
- Figure 10 :** Schéma de principe d'un incubateur destiné à l'élevage d'embryon d'esturgeon européen pouvant contenir jusqu'à 300 individus. L'incubateur mesure 18 cm de longueur, 12 cm de largeur et 12 cm de hauteur il est constitué de PETG. Le volume de l'incubateur est de 1 litre. Les flèches indiquent le sens de circulation de l'eau.....50
- Figure 11 :** Schéma de principe du système d'exposition des embryons d'esturgeon.....51
- Figure 12 :** Localisation des rejets industriels en Garonne et Dordogne dans les 5 kms autour des grands cours d'eaux du bassin de GGD. La couleur des rejets correspond à l'indice METOX (metox/an) utilisé par les agences de l'eau, les points pour lesquels aucune donnée n'a été récoltée n'ont pas été figurés sur la carte. Les quatre sites choisis délimitent la zone dans laquelle des frayères potentielles (hors marée dynamique) ont été relevés.....53
- Figure 13 :** Localisation des rejets industriels en Garonne et Dordogne dans les 5 kms autour des grands cours d'eaux du bassin de GGD. La couleur des rejets correspond à l'indice DBO5 (kg/an) utilisé par les agences de l'eau, les points pour lesquels aucune donnée n'a été récoltée n'ont pas été figurés sur la carte.....54

| | |
|---|----|
| Figure 14 : Boîte à griffes utilisée lors des prélèvements de sédiment sur les frayères..... | 55 |
| Figure 15 : Biofilm sur les galets d'une frayère d'esturgeon européen, site de Saint Caprais (Garonne)..... | 55 |
| Figure 16 : Exposition des embryons de médaka japonais lors du test MELAc..... | 57 |
| Figure 17 : Localisation des sites de dépôts d'incubateurs (gauche) et dispositif de mesures et d'encagement utilisé (droite)..... | 57 |
| Figure 18 : Schéma global de la méthodologie utilisée lors de ce travail et des publications réalisées ou envisagées par rapport aux résultats de ce travail..... | 59 |
| Figure 19: Embryonic mortality (top) and larval survival (bottom) of European sturgeon based on temperature exposure throughout their development (mean±SE) and 30, 50, 70 or 90% O2 sat for the first 48h of incubation. No data were collected for 50 and 30% O2 sat at 12, 16 and 23°C and for 70% O2 sat at 26 and 30°C. Statistical differences between temperature conditions are indicated by different letters (N= 102)..... | 70 |
| Figure 20: Hatching rate (%) of European sturgeon embryos according to temperature and oxygen saturation (N= 102). No data were collected for 50 and 30% O2 sat at 12, 16 and 23°C and for 70% O2 sat at 26 and 30°C..... | 71 |
| Figure 21: Malformation rate (Mean ± SE) in European sturgeon larvae (2 dph) according to temperature exposure throughout their development and 30, 50, 70 or 90% O2 sat for the first 48h of incubation. Because of low survival at this stage, malformation rate could not be evaluated for conditions over 23C and below 70 % O2 sat. No statistical differences were observed between conditions (N=6 except for 20°-90% N=12) | 72 |
| Figure 22. Yolk sac area (mean ± SE) in 2 dph European sturgeon larvae according to temperature exposure throughout their development and 70 or 90% O2 sat for the first 48h of incubation. Statistical differences between temperature conditions are indicated by different letters (N= 31) | 73 |
| Figure 23. Chondral tissue deposition in 2 dph European sturgeon larvae according to temperature exposure throughout their development. Upper panel: Left lateral view; Lower panel: dorsal view. In blue, anatomical sites of chondrous tissue deposition, as visualized by alcian blue staining, were recorded. Arrowheads indicate chondral tissue in the vertebral axis and anal fin (upper panel) and in eye-orbit, dorsal skull and pectoral fins (lower panel). Alcian blue and alizarin red staining on bleached larvae. Same magnification for all pictures, bar =2 mm..... | 73 |
| Figure 24: Number of anatomical sites that displayed chondral tissue deposition (mean ± SE) in 2 dph European sturgeon larvae according to temperature exposure throughout their development and 70 or 90% O2 sat for the first 48h of incubation. Statistical differences between temperature conditions as assessed by Kruskal-Wallis test are indicated by different letters (N= 39)..... | 74 |
| Figure 25: Composite index of tissular development (mean ± SE) in 2 dph European sturgeon larvae according to temperature exposure throughout their development and 70 or 90% O2 sat for the first 48h of incubation. Statistical differences between temperature conditions are indicated by different letters (N= 39)..... | 74 |
| Figure 26: Evaluation of the routine metabolic rate in 2 dph larvae according to temperature exposure throughout their development (mean ± SE) and 90 and 70 %O2 sat for the first 48h of incubation. Because of low survival at this stage, routine metabolic rate could not be evaluated for conditions over 23°C and conditions below 70 % O2 sat. Statistical differences between temperature conditions are indicated by different letters. Stars show differences within a single temperature condition (N= 271)..... | 75 |

- Figure 27:** Two dph European sturgeon larvae swimming speed according to temperature exposure throughout their development (mean \pm SE) and 90 and 70 % O₂ sat for the first 48h of incubation. Because of low survival at this stage, behaviour could not be evaluated for conditions over 23°C and conditions below 70 % O₂ sat. Statistical differences between temperature conditions are indicated by different letters, stars show differences within a single temperature condition (N= 149).....76
- Figure 28:** Number of days for which the daily mean was included in tolerance range (bottom) and exceed critical (up) limits for European sturgeon during their breeding period (May-June). No data concerning oxygen were available for the 1993-2004 period. Temperature data were collected from MAGEST consortium (Portets and Libourne) and MIGADO association (Golfech and Tuilières) in four sites located downstream in Garonne and Dordogne rivers. Oxygen saturation data were from MAGEST consortium (Portets and Libourne) in two sites located downstream in the Garonne and Dordogne rivers.....80
- Fig 29.** Incubators to rear and expose sturgeon eggs to the desired conditions. Arrows = water flow direction.....93
- Fig. 30.** Exposure system for a single condition for embryo and larvae experiment. I.a: feedback circuit; I.b: supply circuit; I.c: peristaltic pump; I.d: buffer tank. II.a: control and recorder units; II.b: pHmeter; II.c: oxymeter; II.d: pH and oxygen probes. III.a: thermistor; III.b: UV lamp; III.c: chiller. IV.a: electrovalve; IV.b: diffusor.....94
- Fig. 31.** Exposure system for oxygen challenge in experiments with juveniles. I.a: supply circuit; I.b: experimental tank; I.c: feedback circuit; I.d: regulation tank for control condition; I.e: water-tower. II.a: control and recorder units; II.b: oxymeter; II.c: oxygen probe. III.a: thermistor; III.b: chiller. IV.a: electrovalve; IV.b: diffusor.....96
- Fig. 32.** Decrease in oxygen saturation of rearing water in the closed circuit during the experiment on juveniles.....96
- Fig. 33.** Hatch Rate (HR) (mean + SE) of *A. sturio* embryos as a function of temperature and oxygen saturation levels. Letters indicate significant differences between O₂ conditions (KW tests) performed for a same temperature (N=6 replicates per condition).....98
- Fig. 34.** Embryonic Survival Rate (ESR) (mean + SE) of *A. sturio* at 6dpf as a function of temperature and oxygen saturation levels. Letters indicate significant differences between O₂ conditions (KW tests) for a same temperature (N=6 replicates per condition).....98
- Fig. 35.** Opercular Beats Frequency (OBF) of *A. sturio* juveniles (n=3) recorded at 20°C (mean \pm SE) at different levels of oxygen saturation. Letters indicate significant differences between oxygen saturation steps (Mann Whitney, p<0.05) or within a temperature experiment (KW, p<0.05).....100
- Fig 36:** Threshold of appearance of adverse effects in *A. sturio* juveniles according to levels of oxygen saturation and temperature (mean \pm SE). Different letters indicate significant differences (Mann Whitney, p=0, n=3).....100
- Figure 37:** Location of the four sampling sites upon the Garonne and Dordogne rivers.....116
- Figure 38:** Embryonic survival rate (mean \pm SE) in Japanese medaka (left bars) and European sturgeon (right bars) according to exposition to river sediment from different locations. Minuscule letters indicates statistical differences between condition in Japanese medaka and capitals letters are used for differences in European sturgeon (Anova, N=3, p <0.05). ...119
- Figure 39:** Hatching rate (mean \pm SE, absolute percentages) in Japanese medaka (left bars) and European sturgeon (right bars) according to exposition to river sediments from different locations. Minuscule letters indicates statistical differences between condition in Japanese medaka and capitals letters are used for differences in European sturgeon (Anova, N=3,

- p<0.05).119
- Figure 40:** Larval survival rate (mean \pm SE) in Japanese medaka (left bars) and European sturgeon (right bars) according to exposition to river sediments from different locations. No statistical differences were observed between conditions (Anova, N=3, p<0.05).....120
- Figure 41:** Swimming speed during resting (mean \pm SE) in Japanese medaka (left bars) and European sturgeon (right bars) according to exposition to river sediments from different locations. No significant difference was observed in both Japanese medaka and European sturgeon (ANOVA, N=3, p>0.05)121
- Figure 42:** DNA strand breaks (mean \pm SE) in Japanese medaka (left bars) and European sturgeon (right bars) exposed to river sediments from different location. Minuscule letters express statistical differences between condition in Japanese medaka and capitals letters are used for differences in European sturgeon.....122
- Figure 43:** Proportion of apoptotic cells (mean \pm SE) in Japanese medaka (left bars) and European sturgeon (right bars) according to exposition to river sediments from different locations. Minuscule letters express statistical differences between condition in Japanese medaka and capitals letters are used for differences in European sturgeon (Anova, N=3, p<0.05).....123
- Figure 44 :** Sampled spawning ground location in the Gironde-Garonne-Dordogne catchment. Red and orange points figure respectively the industrial and domestic releases in the Garonne watershed. Purple points figure industrial release in the Dordogne watershed.....138
- Figure 45:** Embryonic (top) and larval (bottom) survival rate (mean \pm SE) following exposure to sediments from different European sturgeon spawning ground in Dordogne and Garonne rives. Data are classified by river and from the most upstream (on the left) to the most downstream sites (on the right). Significant differences between sites are expressed by minuscule letters. Capitals letters are used to indicate significant differences between rivers.....141
- Figure 46:** Hatching rate (mean \pm SE) following exposure to sediments from different European sturgeon spawning grounds in Dordogne and Garonne rivers. Data are classified by river and from the most upstream (on the left) to the most downstream site (on the right). Significant differences between sites are expressed by minuscule letters. Capital letters indicate significant difference between rivers and control.....143
- Figure 47:** Head length - total body length ratio (mean \pm SE) following exposure to sediments from different European sturgeon spawning grounds in Dordogne and Garonne rivers. Data are classified by river and from the most upstream (on the left) to the most downstream site (on the right). Significant differences between sites are expressed by minuscule letters. Capital letters indicate significant difference between rivers and control.....143
- Figure 48:** Malformation score/5 (mean \pm SE) following exposure to sediments from different European sturgeon spawning grounds in Dordogne and Garonne rivers. Data are classified by river and from the most upstream (on the left) to the most downstream site (on the right). Significant differences between sites are expressed by minuscule letters. Capital letters indicate significant difference between rivers and control.....144
- Figure 49:** Proportion of DNA in comet tail (mean \pm SE) following exposure to sediments from different European sturgeon spawning grounds in Dordogne and Garonne rivers. Data are classified by river and from the most upstream (on the left) to the most downstream site (on the right). Significant differences between sites are expressed by minuscule letters. Capital letters indicate significant difference between rivers and controls.....145

| | |
|--|-----|
| Figure 50: Proportion of hedgehogs cells in comet assay (mean \pm SE) following exposure to sediments from different European sturgeon spawning grounds in Dordogne and Garonne rivers; Data are classified by river and from the most upstream (on the left) to the most downstream site (on the right). Significant differences between sites are expressed by minuscule letters. Capital letters indicate significant difference between rivers and controls..... | 146 |
| Figure 51: Correlation circle from PCA analysis. Variables used in this study are noticed as TailDNA for stand break proportion, malformation for score /5 malformation index, embryosurvival and larvalsurvival for embryonic and larval survival rate respectively, ratio is used for head length-total length ratio..... | 149 |
| Figure 52: Embryonic (top) and larval (bottom) cumulated mortality of European sturgeon driving pollutant exposure throughout their development at two different temperatures (mean \pm SE). Statistical differences between conditions of exposure are indicated by different letters (N= 3)..... | 165 |
| Figure 53: Hatching rate of European sturgeon embryos following pollutant exposure throughout their development at two different temperatures (mean \pm SE). Statistical differences between conditions are indicated by different letters (N= 3)..... | 166 |
| Figure 54: Half hatching time (hours post fertilization, hpf) of European sturgeon embryos following pollutant exposure throughout their development at two different temperatures (mean \pm SE). Statistical differences between conditions are indicated by different letters (N= 3)..... | 167 |
| Figure 55: Malformation index score /3 of European sturgeon larvae following pollutant exposure throughout their development at two different temperatures (mean \pm SE). Statistical differences between conditions are indicated by different letters (N= 3)..... | 168 |
| Figure 56: Comparison between a normal larvae (left) and a deformed larvae (center and right) at the same developmental stage..... | 169 |
| Figure 57: Evaluation of the routine metabolic rate in 2 dph larvae of European sturgeon following pollutant exposure throughout their development at two different temperatures (mean \pm SE). Statistical differences between conditions are indicated by different letters (N= 3)..... | 169 |
| Figure 58: Evaluation of swimming speed behaviour in 2dph larvae of European sturgeon following pollutant exposure throughout their development at two different temperatures (mean \pm SE). Statistical differences between conditions are indicated by different letters (N= 3 and N=2 for 3X-20°C condition). | 170 |
| Figure 59 : Nombre de jours pour lesquels les températures des masses d'eau enregistrées dépassent les seuils de tolérance embryo-larvaire de l'esturgeon européen sur cinq bassins versants pendant la période de reproduction de l'espèce. Les données ont été mesurées pour les mois de juin et juillet pour le Rhin et la Seine et les mois de mai et juin pour la Gironde, le Rhône et le Douro en se basant sur période de reproduction estimées par Magnin (1962). Les graphiques de gauche montrent le dépassement des seuil critiques de tolérance TcI et TcII et les graphiques de droite montrent le dépassement des seuils optimum TpI et TpII..... | 189 |

II. Tables

| |
|--|
| Table 1 : Récapitulatif des principaux polluants métalliques rencontrés dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne. L'origine des données est exprimée par les numéros (1) équipe |
|--|

| | |
|---|-----|
| TGM (Transferts Géochimiques des Métaux à l'interface continent océan) UMR EPOC (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux) Université de Bordeaux, (2) laboratoire LIENS (LIttoral ENvironnement et Sociétés) Université de La Rochelle, (3) Agence de l'eau Adour-Garonne. MES : Matière en suspension. | 39 |
| Table 2 : Récapitulatif des principaux polluants organiques rencontrés dans le bassin de Gironde-Garonne-Dordogne. L'origine des données est exprimée par les numéros (1) équipe LPTC (Laboratoire de Physico- et Toxico-Chimie de l'environnement) UMR EPOC Université de Bordeaux et (2) Agence de l'eau Adour-Garonne..... | 40 |
| Table 3 : Liste des 11 sites sélectionnés classés par rivière et distance à la mer. La raison ayant poussé au choix du site est notée dans la colonne de droite..... | 53 |
| Table 4: Oxygen and temperature conditions tested. The numbers correspond to the number of replicates performed for each condition tested. For each condition, embryos from two different genetics (except for 20°C and 90 % O ₂ sat condition for which four parental origins were used) were used in triplicate to obtain six replicates. At the beginning of the experiment, each replicates were filled with 150 embryos..... | 66 |
| Table 5: Exposure conditions selected for experiments with European sturgeon larvae and juveniles. Temperature and oxygen saturation were combined to obtain six oxy-thermal conditions..... | 93 |
| Table 6: Genetic cross effects on hatching and survival on larvae..... | 99 |
| Table 7: Developmental deformities observed in larvae at hatching according to exposure conditions and species. Data are expressed in proportion of impaired larvae (mean \pm SE; N = 3)..... | 120 |
| Table 8: Evaluation of toxicological effects in European sturgeon, compared to Blank condition, according to exposure condition and criterion tested. No effect is expressed using -, low and high toxic effect is expressed by + and ++..... | 124 |
| Table 9: Evaluation of toxicological effects in Japanese medaka, compared to Blank condition, according to exposure condition and criterion tested. No effect is expressed using -, low and high toxic effect is expressed by + and ++..... | 124 |
| Table 10: Spawning grounds selected to be sampled and tested..... | 139 |
| Table 11: Summary indicating for each site the number of acute or subacute effect that appeared significantly different from Ctrl (Substratum) condition. The total score was established adding one time the number of subacute effects and two times for acute effects. The higher is the total score, the more unfavourable is the site..... | 149 |
| Table 12: Pollutants used in this study based on field concentrations found in La Réole sediment samples. In each category the most abundant pollutant was selected. For PCB and OCP, the most important pollutant was selected and concentration attributed correspond to the sum of concentration of all pollutant of its category. No pharmaceutical compound was found in La Réole sediment samples..... | 162 |
| Table 13: Developmental deformities observed in larvae at hatching according to exposure conditions species. Data are expressed in proportion of impaired larvae (mean \pm SE; N=3)..... | 168 |